

Rho GTPasen der RhoBTB Familie: Charakterisierung und Rolle in der Tumorentstehung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von

Jessica Berthold

aus Gummersbach

Köln, im Mai 2006

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Angelika A. Noegel
Prof. Dr. Thomas Langer

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 30. Juni 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2003 bis Mai 2006 unter Anleitung von Prof. Dr. Angelika A. Noegel und der Betreuung von PD Dr. Francisco Rivero am Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie I der Universität zu Köln angefertigt. Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter für ihre Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die schöne Atmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank:

- **PD Dr. Francisco Rivero** für die Bereitstellung des interessanten Themas, freundliche Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft sowie für seine Hilfe bei jeglichen Niederschriften,
- **Prof. Dr. Angelika A. Noegel** für die Gelegenheit an ihrem renomierten Institut meine Dissertation anfertigen zu dürfen,
- **Prof. Dr. Thomas Langer** für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und **Prof. Dr. Siegfried Roth** für die Übernahme des Prüfungsvorstandes,
- **Dr. Pontus Aspenström** und seiner Arbeitsgruppe in Uppsala für die freundliche Aufnahme und wertvollen Ratschläge,
- **Prof. Dr. Wilhelm Bloch** für die unentbehrliche Hilfe bei der ISH, **Dr. Paola Zigrino** und **Prof. Dr. Cornelia Mauch** für die Bereitstellung von RNA-Hautproben, **Dr. Yue Xiong** für die Bereitstellung von Cullin-Konstrukten und **Dr. Jeffrey Singer** für die Bereitstellung von Cullin3-Antikörpern,
- **ZMMK** für die finanzielle Unterstützung und hilfreichen Einrichtungen,
- **Bettina** und besonders **Dörte** für die freundliche und immer präzise Hilfe bei allen organisatorischen Problemen,
- **Budi** und **Gudrun** für ihre Hilfe bei sämtlichen EDV-Problemen,
- **Rolf** für die unentbehrlichen Tipps in Fragen der Biochemie und Molekularbiologie,

- **Maria** für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor, insbesondere bei Fragen der Immunhistochemie,
- **Martina** für ihre Beratung und Unterstützung in jeglicher Hinsicht,
- **Alex** und **Kathrin** für ihre technische Unterstützung und humorvolle Laboratmosphäre,
- **Christoph** für die vielen Ratschläge, **Rosi** für ihre Hilfe mit den Hefekulturen, **Berthold** für die Hilfe in der Zellkultur und **Bärbel, Brigitte** und **Sonja** für die tägliche Unterstützung mit Labormaterialien,
- meiner **Arbeitsgruppe**, der ich ganz besonders für die gute Zusammenarbeit, tatkräftige Unterstützung, Verpflegung in „Notsituationen“ und vielen schönen Momente danken möchte,
- **Georgia, Eva-Maria, Marion, Akis, Martina, Ria, Hafi, Yogi, Soraya, Thorsten** und **Uli**, die mich immer freundschaftlich innerhalb und außerhalb des Labors unterstützt haben (Ich werde Euch nie vergessen!),
- **Caro** für jegliche Laborunterstützung, für drei Jahre „BTB-Gemeinschaft“ und für so viele schöne, lustige und chaotische Geschichten,
- **Anja**, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und liebevoll geholfen hat, z.B. mit dem „ICH-SCHREIBE-MEINE-DISSERTATION“ - Überlebenspaket,
- meinen **Eltern**, meiner Schwester **Kathy** mit **Patrick** für die vorbehaltlose Unterstützung in allen Lebenslagen und dass ihr immer für mich da seid,
- und **Roland**, der mir während dieser Arbeit so viel Kraft gegeben hat, mir immer tatkräftig geholfen hat und mir jederzeit aufbauend zur Seite stand. Schön, dass es Dich gibt!

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGEN	6
1 EINLEITUNG	9
1.1 Kleine GTPasen der Rho-Familie	9
1.2 Regulation der Rho GTPasen	11
1.2.1 Der Rho GTPase-Zyklus	11
1.2.2 Posttranslationale Modifikationen.....	12
1.3 RhoBTB Proteine	12
1.4 BTB Proteine als Adaptoren in Ubiquitinierungsprozessen	14
1.4.1 Das Ubiquitin-Konjugationssystem.....	14
1.4.2 Die BTB Domäne	15
1.4.3 Cullin-abhängige Ubiquitin-Ligasen.....	17
1.5 Rho GTPasen in der Tumorentstehung	18
1.6 Pathologische Auswirkungen von Abberationen in Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexen	20
1.7 Zielsetzung der Arbeit	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.1.1 Labormaterial	23
2.1.2 Geräte	24
2.1.3 Kits	25
2.1.4 Puffer und andere Lösungen.....	26
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien	27
2.1.6 Enzyme, Antikörper und Inhibitoren	29
2.1.7 Vektoren.....	31

2.1.8	Oligonukleotide	32
2.1.9	Konstrukte	33
2.1.10	Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien	36
2.1.11	Kultur-Medien	37
2.2	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.2.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA nach Roche/Macherey-Nagel	41
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	43
2.2.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	43
2.2.6	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
2.2.7	In vitro-Rekombination von DNA	44
2.2.8	DNA-Sequenzierung	45
2.2.9	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	46
2.2.10	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen	46
2.2.11	Radioaktive Markierung von DNA-Proben	47
2.2.12	Untersuchung der Genexpression	47
2.2.13	Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden	48
2.2.14	Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen gemäß Qiagen	48
2.2.15	Reverse Transkriptase-Reaktion	49
2.3	Proteinchemische Methoden	50
2.3.1	Proteinexpression	50
2.3.2	Aufreinigung von Proteinen	50
2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	52
2.3.4	Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern	52
2.3.5	Immunpräzipitation	54
2.3.6	GST-Kopräzipitation	55
2.3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.3.8	Färbung von Polyacrylamidgelen	56
2.3.9	Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)	57
2.3.10	Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	57
2.3.11	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose	58
2.3.12	Entfernung der Antikörper nach Immundetektion	58

2.4	Zellbiologische Methoden	59
2.4.1	Kultur von Säugerzellen	59
2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen.....	59
2.4.3	Transfektion von Säugetierzellen.....	59
2.4.3	Fluoreszenzmikroskopie	60
2.4.4	Immunhistochemische Färbung	61
2.5	„Yeast Two Hybrid“-System	62
2.5.1	Modifizierte Lithiumacetat-Hefetransformationsmethode	62
2.5.2	Hefepaarung (Mating)	63
2.5.3	Filterassay der Galaktosidaseaktivität.....	64
2.6	<i>In situ</i>-Hybridisierung	64
2.6.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	64
2.6.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung	65
3	ERGEBNISSE	68
3.1	Aufreinigung polyklonaler Antikörper gegen RhoBTB3	68
3.1.1	Affinitätschromatographische Antikörperaufreinigung	68
3.1.2	Überprüfung der Antikörperspezifität.....	69
3.2	Expressionsanalyse der RHOBTB Gene im Gewebe	69
3.2.1	Expression der RHOBTB Gene in Geweben der Maus.....	70
3.2.2	Expression der RHOBTB Gene in einer Endothelzelllinie	71
3.3	RhoBTB Proteine können Dimere ausbilden	72
3.3.1	Homodimerisierung	72
3.3.2	Heterodimerisierung.....	73
3.3.3	Intramolekulare Interaktion.....	74
3.3.4	RhoBTB2 kolokalisiert mit RhoBTB3.....	75
3.3.5	Kartierung der Dimerisierungsdomäne von RhoBTB	76
3.4	Abbau der RhoBTB Proteine durch das Proteasom	77
3.5	Intramolekulare Interaktion verhindert Abbau der RhoBTB Proteine	79

3.6	Interaktion der RhoBTB Proteine mit Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexen	80
3.6.1	Interaktion mit Cullinen.....	80
3.6.2	Interaktion mit dominant negativen Cullinen	83
3.6.3	Die erste BTB Domäne bindet Cullin3.....	84
3.7	Interaktion der RhoBTB Proteine mit weiteren Faktoren der Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexen.....	85
3.7.1	Ubiquitin konjugierende Enzyme (E2).....	85
3.7.2	Ring Box Proteine (Roc1)	87
3.8	Expression der RhoBTB Proteine in Bakterienzellen.....	89
3.9	Subzelluläre Lokalisation der RhoBTB Proteine	90
3.9.1	Subzelluläre Lokalisation von RhoBTB1 und RhoBTB2.....	91
3.9.2	Lokalisation von RhoBTB3.....	92
3.10	Rolle der RhoBTB Proteine in der Tumorentstehung.....	95
3.10.1	Expressionsanalyse bei einem <i>cancer profiling array</i>	96
3.10.2	Korrelationsanalysen von RHOBTB und CUL in einem CPA	99
3.10.3	Semi-quantitative Analyse der Genexpression in Tumorzelllinien_der Haut .	102
3.10.4	Expressionsanalyse bei einem <i>cancer cell line profiling array</i>	103
3.11	Bindungspartner von RhoBTB Proteinen.....	111
4	DISKUSSION	113
4.1	RhoBTB als Adaptor in Cullin-abhängigen Komplexen	113
4.2	Subzelluläre Lokalisation von RhoBTB Proteinen.....	116
4.3	Expression der RhoBTB Proteine im Gewebe	118
4.4	RhoBTB Proteine in der Tumorentstehung.....	120
4.5	Einflüsse verschiedener Behandlungen auf RHOBTB Gene	123
4.6	Modell der RhoBTB Proteine in der Tumorentstehung	124
4.7	Ausblick.....	126

5	ZUSAMMENFASSUNG	127
6	ABSTRACT.....	129
7	LITERATUR.....	131
	ANHANG.....	139
	ERKLÄRUNG	146
	LEBENS LAUF	147

Abkürzungen

³² P	radioaktives Phosphoratom
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Cytosin
cDNA	revers transkribierte DNA (<i>complementary DNA</i>)
CPA	<i>cancer profiling array</i>
CCLPA	<i>cancer cell line profiling array</i>
COS7	SV40-transformierte Affennierenzelllinie
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP's	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Protein-Ligase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FL	vollständige Sequenz (<i>full length</i>)
G	Guanin

GAP	GTPase aktivierende Proteine (<i>GTPase activating protein</i>)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GDI	Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitor (<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren(<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	kiloDalton
LOH	Heterozygotieverlust (<i>loss of heterozygosity</i>)
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NBT	4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid
NP-40	Nonidet P-40
p.A.	pro analysi
PALA	N-(Phosphonacetyl)-L-Aspartat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-phenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalindisulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
SV40	Simian Virus 40
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
Ub	Ubiquitin
ü.N.	über Nacht
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

Einheiten von Messungen und Präfixe:

°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
sek	Sekunde
Std	Stunde

1 Einleitung

1.1 Kleine GTPasen der Rho-Familie

Die Ras (*rat sarcoma*) Superfamilie der kleinen (monomeren) GTPasen beinhaltet ca. 100 Mitglieder, die anhand ihrer Proteinhomologie in Kombination mit ihrer Funktion in 6 Familien unterteilt werden: Ras, Ran, Rad, Rab, Arf/Sar1 und Rho. Jedes Familienmitglied hat mindestens 40% der Aminosäuresequenz mit den anderen Mitgliedern identisch und umfasst konservierte Motive, die an der Interaktion verschiedener Klassen von Effektoren beteiligt sind (Bourne et al., 1991; Takai, 2001).

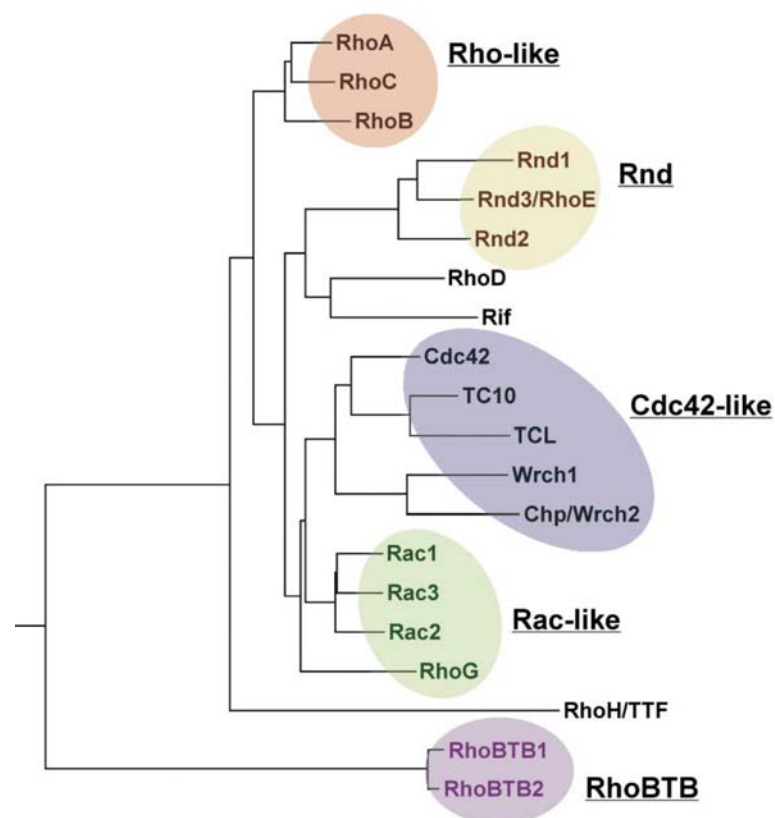


Abbildung 1.1 Phylogenetischer Baum der Rho GTPasen. Eine Analyse der Aminosäuresequenz und funktionellen Daten zeigt fünf große Unterfamilien: RhoA-ähnliche (*Rho-like*), Rac-ähnliche (*Rac-like*), Cdc42-ähnliche (*Cdc42-like*), Rnd und RhoBTB Proteine. Die anderen Proteine RhoD, Rif und RhoH/TFF sind offensichtlich keiner Familie zuzuordnen. Die GTPase Domäne von RhoBTB3 ist gering konserviert und deshalb den typischen Rho GTPasen nicht zuzuordnen (Burrige und Wennerberg, 2004).

Die Rho (*ras homologous*) Familie der kleinen GTPasen zeichnet sich strukturell durch eine so genannte Rho Insertion zwischen dem fünften β -Faltblatt und der vierten α -Helix in der GTPase Domäne aus (Valencia et al., 1991). Sie ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Vesikeltransport, Morphogenese, Mikrotubuli-

Organisation, Zytokinese, Genexpression, Zellzyklus-Progression, Apoptose und Tumorigenese beteiligt. Viele Rho GTPasen stellen einen Angelpunkt in der Reorganisation des Zytoskeletts dar oder regulieren Signaltransduktionswege, die zu einer veränderten Genexpression führen, den Zell-Zykluseintritt und das Zellüberleben regulieren (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005). In Säugetieren wurden bisher 20 Proteine der Rho Familie beschrieben, die aufgrund ihrer Effekte auf die Aktinorganisation in folgende Unterfamilien eingeteilt werden: Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Chp, Wrch-1), Rac (Rac1-3, RhoG), Rho (RhoA-C), Rnd (Rnd1-2, Rnd3/RhoE), RhoD (RhoD und Rif), RhoH/TTF und RhoBTB (RhoBTB1-2) (Aspenström et al., 2004, Burridge und Wennerberg, 2004; Abb. 1.1). Ein weiteres RhoBTB Protein ist RhoBTB3. Die GTPase Domäne von RhoBTB3 ist gering konserviert und besitzt keine typische Rho Domäne. Alle RhoBTB Proteine sind deutlich größer als die klassischen kleinen GTPasen und verfügen neben der GTP-bindenden Domäne über zusätzliche Domänenstrukturen. RhoGTPasen existieren auch in anderen Spezies. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* weist fünf Rho Proteine (Rho1, 2, 3, 4 und Cdc42), *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* weisen sogar zehn bzw. elf Rho Proteine auf.

Rac Proteine beeinflussen die Formation von Lamellipodien und Membranausstülpungen, Rho Proteine koordinieren Stressfasern und die Plattform der Zelladhäsion und Cdc42 Mitglieder stimulieren die Formation der Filopodien (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Rac und Cdc42 für die Akkumulation des WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) erforderlich sind und den Arp2/3 Komplex aktivieren (Ho et al., 2004, Innocenti et al., 2004), während Rho Formine die Aktinpolymerisation aktivieren (Zigmond, 2004). Die Rnd GTPasen spielen bei der Zelladhäsion und Bildung der Stressfasern eine Rolle (Guasch et al., 1998; Nobes et al., 1998), RhoD und Rif induzieren Filopodien, sind aber auch am Endozytoseprozess beteiligt (Murphy et al., 1996; Ellis et al., 2000). Als Antagonist anderer GTPasen durch Aktivierung von NFκB und p38 MAP-Kinase wird RhoH/TTF postuliert (Li et al., 2002). Vor kurzem wurden Miro Proteine entdeckt, die zwei putative GTPase Domänen sowie zwei EF-Hände, die der Calciumbindung dienen, besitzen. Sie sind in den Mitochondrien lokalisiert (Fransson et al., 2003). Die Zuordnung der Miro Proteine (Miro-1 und Miro-2) zur Unterfamilie der Rho GTPasen ist umstritten (Wennerberg und Der, 2004).

1.2 Regulation der Rho GTPasen

1.2.1 Der Rho GTPase-Zyklus

Alle Mitglieder der kleinen GTPasen agieren als molekulare Schalter, indem sie zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Status wechseln (Abb. 1.2). Dieser Prozess ist durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF, *guanine nucleotide exchange factors*) und GTPase aktivierende Proteine (GAP, *GTPase activating proteins*) reguliert.

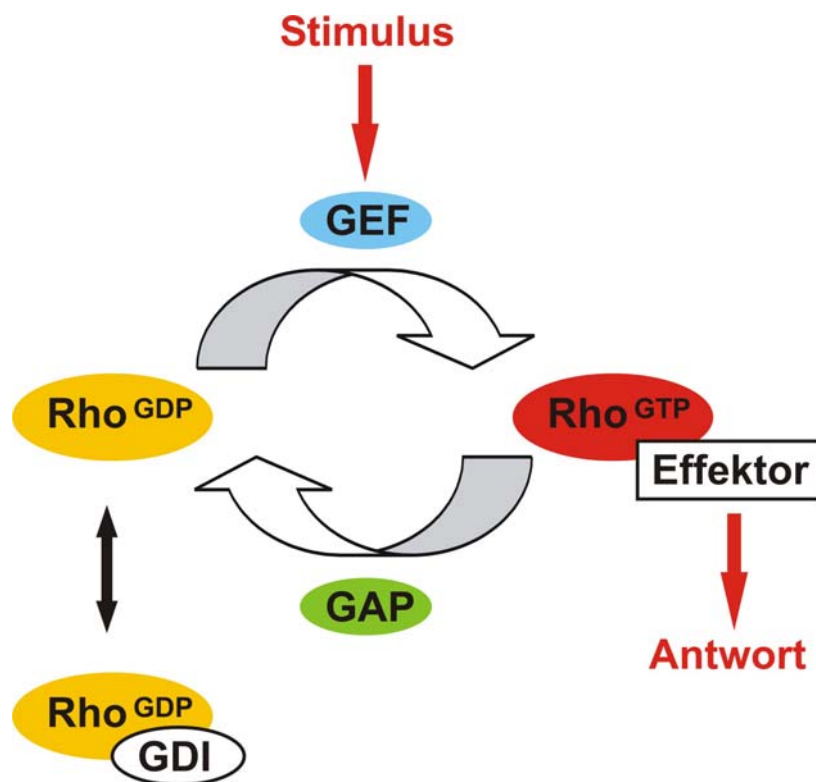


Abbildung 1.2 Die Regulation der Rho GTPase Aktivität. GTPase aktivierende Proteine (GAPs) inaktivieren die Rho GTPase, indem sie Rho anregen, sein gebundenes GTP zu hydrolysieren. Die inaktive GTPase bleibt fest mit GDP verbunden. Guanin-Nukleotidaustauschfaktoren aktivieren Rho und veranlassen es, sein GDP abzugeben. Die Konzentration von GTP im Zytosol ist zehnmal größer als die Konzentration von GDP. Deswegen bindet Rho schnell wieder GTP. GDIs inaktivieren den Komplex und blockieren die GDP-Dissoziation, indem sie die GDP-gebundene GTPase binden.

GEFs fördern den Austausch von gebundenem Nukleotid, indem sie die Dissoziation von GDP und die nachfolgende Aufnahme von GTP beschleunigen. GAPs hingegen erhöhen die Hydrolysegeschwindigkeit, wodurch die GTPase inaktiviert wird. Zudem gibt es Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDI, *guanine nucleotide dissociation inhibitor*), die bevorzugt GDP-gebundene GTPasen binden und die spontane und GEF-katalysierte Nukleotidfreigabe verhindern. Die GTPase bleibt in

ihrem inaktiven Zustand. Punktmutationen in der Sequenz der GTPasen resultieren in einer konstitutiv aktiven (V12, L61) oder dominant negativen Form (N17). Rho GTPasen können aber auch durch direkte Phosphorylierung und Ubiquitinierung reguliert werden (Lang et al., 1996; Wang et al., 2003), jedoch ist es noch unklar, inwieweit diese Modifikationen einen physiologischen Einfluss haben. Die Effektoren binden die GTPase in ihrer GTP-gebundenen aktiven Form und erzeugen eine Vielzahl von Antwortprozessen. Über 50 Effektoren sind bisher für Rho, Rac und Cdc42 beschrieben worden.

1.2.2 Posttranslationale Modifikationen

Fast alle Rho GTPasen werden im Zytosol synthetisiert und durch Anfügen von C15 Farnesyl oder C20 Geranylgeranyl, die über eine Thiobrücke mit Cystein am C-Terminus verknüpft sind, kovalent verändert. Die Prenylierung führt zur Membranassoziation und benötigt ein CAAX-Motiv am C-Terminus, wobei C Cystein, A ein aliphatischer AS-Rest und X eine beliebige AS sind. Bei X = Serin, Methionin, Alanin, Cystein oder Glutamin wird das Protein farnesyliert; bei X = Leucin oder Isoleucin wird eine Geranylgeranylgruppe angebracht. Nach der Prenylierung werden die drei terminalen Reste abgespalten und der Cystein-Rest wird mit S-Adenosylmethionin als Methyl donor methyliert. Die Enzyme hierfür sind im ER lokalisiert (Zhang, 1996). Das CAAX-Motiv alleine führt Proteine zum ER und Golgi (Choy, 1999). Diese posttranslationale Modifikation kann die für die Funktion der GTPase entscheidend sein. Wird die Prenylierung des Ras Proteins verhindert (Mutation, Inhibitoren), so wird die Plasmamembranassoziation unterbunden und das Produkt des Ras-Gens verursacht keine unkontrollierte Zellteilung; die krebserregende Wirkung des Ras Proteins hängt von der Gegenwart der Farnesylgruppe ab (Hancock, 1990). Die Rho GTPasen RhoA und RhoB zeigen ohne Prenylierung einen Verlust der Aktivität und bei RhoB wird sogar die Funktion mit der Prenylierung bestimmt (Lebowitz, 1997).

1.3 RhoBTB Proteine

Kürzlich wurde eine neue Subfamilie der Rho GTPasen identifiziert (Rivero, 2001). Die RhoBTB Proteine umfassen – im Gegensatz zu allen anderen Proteinen der Ras Superfamilie - 600 Aminosäuren und werden durch eine GTPase Domäne, eine

Prolin-reiche Region, einem Tandem von zwei BTB Domänen und einem Carboxyl-Terminus von unbekannter Funktion charakterisiert. Die BTB-Domäne (s. 1.4.2) ist für eine Vielzahl an zellulären Funktionen verantwortlich: Transkription, Organisation des Zytoskeletts, Aufbau sowie Mechanismus von Ionenkanälen und Ubiquitinierung von Proteinen (Stogios et al., 2005). RhoBTB Proteine werden in Vertebraten durch drei Isoformen (RhoBTB1 bis RhoBTB3) repräsentiert, wobei Orthologe in Insekten und *Dictyostelium* (*RacA*), jedoch nicht in Pilzen und Pflanzen, existieren (Abb. 1.3). RhoBTB Proteine haben wahrscheinlich eine andere Funktion als klassische Rho GTPasen, weil sie keinen offensichtlichen Effekt auf das Aktin-Zytoskelett ausüben (Aspenström et al., 2004).

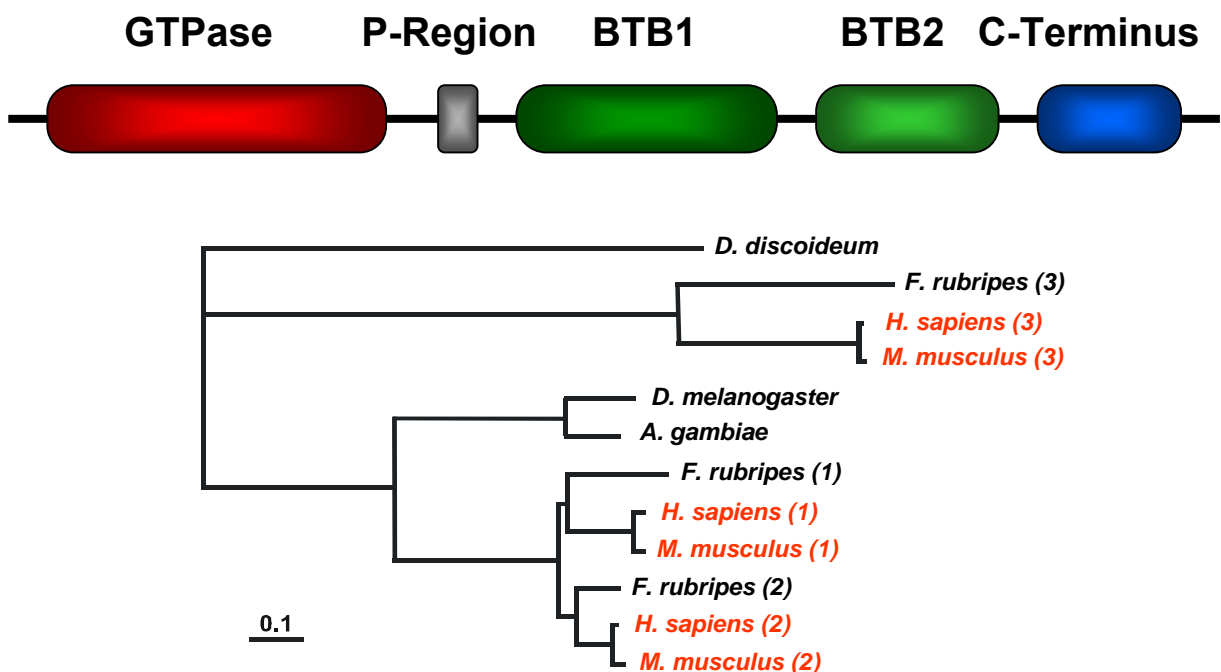


Abbildung 1.3 Die Domänenstruktur und phylogenetischer Baum der RhoBTB Proteine. RhoBTB Proteine besitzen eine für Rho GTPasen ungewöhnliche Domänenorganisation: GTPase Region, Prolin-reiche Region, zwei BTB Domänen und einen C-Terminus. Phylogenetischer Stammbaum von drei RhoBTB Proteinen von *Homo sapiens*, *Mus musculus* (rot) und *Fugu rubripes* sowie den orthologen Proteinen von *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* ist dargestellt. In Klammern sind die verschiedenen Isoformen dargestellt. Der Balken repräsentiert 10% genetischen Abstand (Ramos et al., 2002).

RhoBTB1 und RhoBTB2 sind mit 79% Ähnlichkeit sehr verwandt, RhoBTB3 divergiert mit 43% Ähnlichkeit hingegen mehr und zeigt als einziger Vertreter ein Prenylierungssignal am C-Terminus auf (Ramos et al., 2002). RhoBTB1 und RhoBTB2 verfügen über die Rho Insertion, die Rho GTPasen von allen anderen Ras

Superfamilie Proteinen unterscheidet, wohingegen RhoBTB3 gering konserviert ist. Die Genstruktur und Expressionsprofile der drei RHOBTB Gene von Mensch und Maus sind bekannt (Ramos et al., 2002). RHOBTB1 (Chromosom 10q21.1) und RHOBTB2 (Chromosom 8p21.2) haben eine ähnliche Intron/Exon Organisation. Im Gegensatz dazu weicht die Intron/Exon Organisation von RHOBT3 (Chromosom 5q14.3) erheblich von den anderen beiden Genen ab. Humanes RHOBTB1 und RHOBTB3 sind ubiquitär exprimiert, allerdings mit unterschiedlichen Expressionsmustern: RHOBTB1 zeigt hohe Expressionslevel in Magen, Skelettmuskel, Plazenta, Niere, Testis und Ovar, während RHOBTB3 in Gehirn, Herz, Pankreas, Testis und Ovar hohe Expressionen zeigt. RHOBTB2 wird nur sehr gering exprimiert (Ramos et al., 2002).

1.4 BTB Proteine als Adaptoren in Ubiquitinierungsprozessen

1.4.1 Das Ubiquitin-Konjugationssystem

Der selektive Abbau von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System ist wichtig für nahezu alle zellulären Prozesse und ihre Regulation (Glickmann und Ciechanover, 2002; Dias et al., 2002). Ubiquitin wird für seine Verknüpfung mit anderen Proteinen von dem ATP-abhängigen Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) zunächst aktiviert und dann auf eine von einer Gruppe von Ubiquitin verknüpfenden Enzymen (ubiquitin-conjugating enzymes, E2) übertragen (Abb. 1.4). Die E2-Enzyme arbeiten zusammen mit Hilfsproteinen (E3). Im E2-E3-Komplex, der so genannten Ubiquitinligase, bindet die E3-Komponente an spezifische Abbausignale der Proteinsubstrate und hilft so dem E2-Enzym bei der Bildung einer an Lysin des Substrats gebundenen Multi-Ubiquitinkette (Weissman, 2001). In seltenen Fällen sind zusätzlich E4-Faktoren notwendig, die nicht direkt mit einem E2-Enzym interagieren und für einen E3-Komplex notwendig sind (Koegl et al., 1999). In Säugerzellen gibt es je ein E1-Enzym (Haas und Siepmann, 1997) und mindestens 30 verschiedene E2-Enzyme, die über eine katalytische Ubiquitin-konjugierende (Ubc; ubiquitin conjugating) Domäne verfügen (Jentsch, 1992). E3-Enzyme bilden die größte Gruppe und lassen sich in drei Klassen unterteilen: HECT-Ligasen, RING-Finger-Ligasen und U-Box-Ligasen (Scheffner et al., 1995; Jackson et al., 2000; Pickart et al., 2001; Aravind und Koonin, 2000).

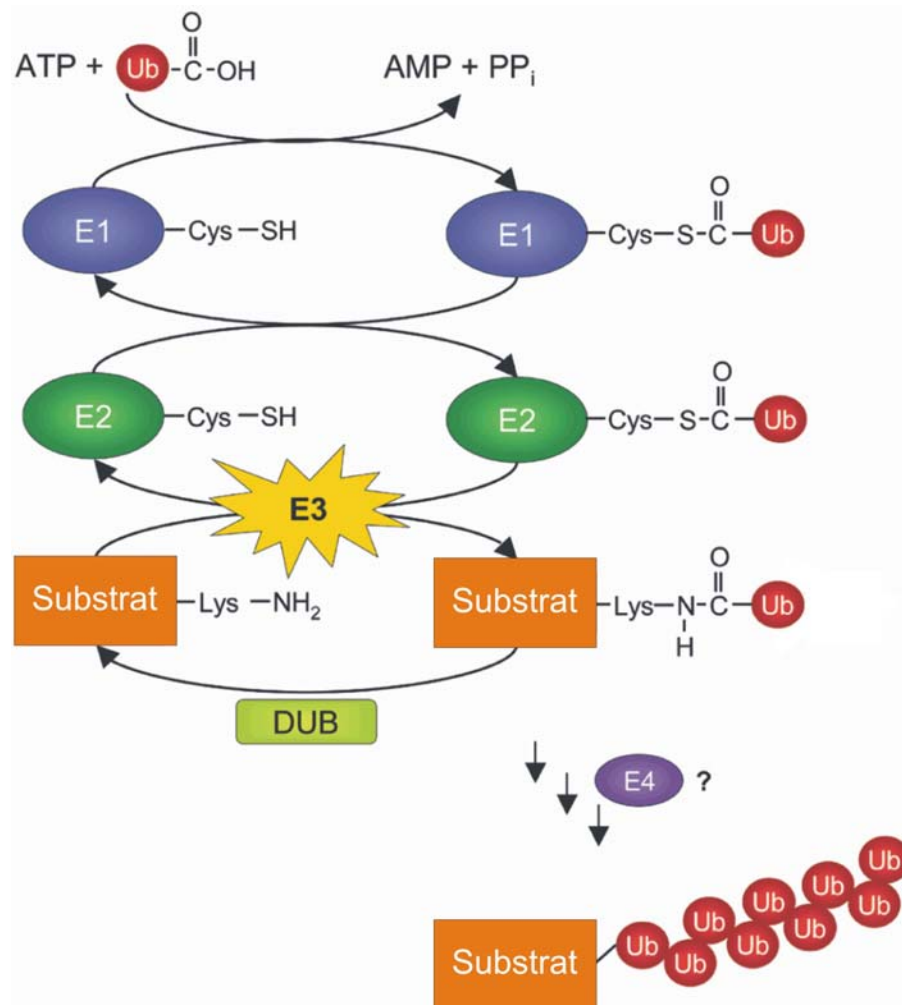


Abbildung 1.4 Markierung von Proteinen mit Multi-Ubiquitinketten. Der C-Terminus von Ubiquitin wird anfänglich über eine energiereiche Thioesterbindung mit einer Cysteinseitenkette des E1-Proteins aktiviert. Diese Reaktion benötigt ATP und läuft über ein kovalentes Ubiquitin-AMP-Intermediat ab. Das aktivierte, an E1 (Ubiquitin aktivierendes Enzym) gebundene Ubiquitin, wird dann auf das Cystein eines der verschiedenen E2-Moleküle übertragen. Die E2-Enzyme liegen im Komplex mit einer noch größeren Familie von E3-Enzymen vor. Die E2-Enzyme werden als Ubiquitin verknüpfende Enzyme bezeichnet. Im E2-E3-Komplex, der so genannten Ubiquitinligase, bindet die E3-Komponente an spezifische Abbausignale der Proteinsubstrate und transferiert die gebundenen Multi-Ubiquitinkette an Lysin des Substrats. E4-Faktoren können nicht mit E2 interagieren, sind aber für die E3-Ligaseaktivität notwendig. Deubiquitinierungs-Enzyme (DUBs) entfernen Ubiquitin-Modifikationen (modifiziert nach Passmore und Barford, 2004).

1.4.2 Die BTB Domäne

Die BTB Domäne wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* als Transkriptionsregulator (*Broad-Complex*, *Tramtrack*, *Bric à brac*) und in vielen Pox Virus Zink-Fingern (POZ) gefunden und stellt eine konservierte Domäne dar (Bardwell und Treisman, 1994). Die Komponente Cullin3 wurde als Bindungspartner von BTB Domänen in *S. pombe* (Xu, 2003; Furukawa, 2003) und *C. elegans*

(Pintard, 2003) entdeckt. Selbst die Bindung von humanem RhoBTB2 mit Cullin3 konnte gezeigt werden (Wilkins, 2004). In den meisten Fällen agiert die BTB Domäne als Protein-Protein-Interaktionsdomäne sowohl bei BTB-Assoziationen als auch bei Interaktion mit Proteinen ohne BTB Domäne. Einige funktionelle Aufgaben sind Transkription, Zytoskelett-Regulation sowie Tetramerisierung und Regulation von Ionenkanälen (zusammengefasst in Stogios et al, 2005). Einige BTB Strukturen wurden bereits kristallisiert und die Proteinfaltungen auf strukturelle Ähnlichkeiten untersucht. Die BTB Domäne in BTB-Zink-Fingern, Skp1, ElonginC und spannungsgesteuerten Kaliumkanälen T1 beinhaltet immer eine konservierte BTB Faltung, obgleich die peripheren Sekundärstrukturen unterschiedlich sind. In eine dreidimensionalen Ansicht umfasst der konservierte Bereich 95 Aminosäuren und zeigt fünf α -Helices und an einem Ende drei β -Faltblätter (Abb. 1.5).

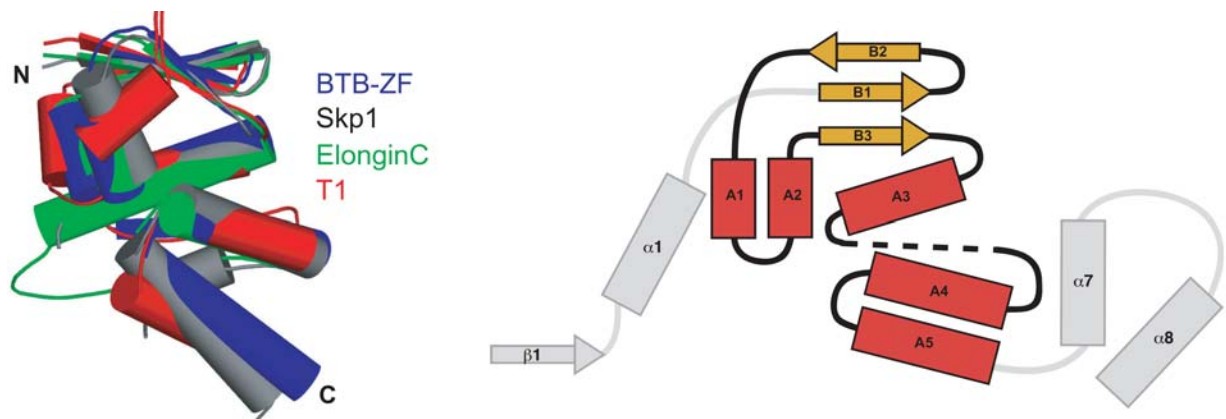


Abbildung 1.5 Vergleich der BTB-Struktur. Der Kern von 95 Aminosäuren der BTB Domäne ist für BTB-Zink-Finger (BTB-ZF), Skp1, ElonginC und T1 gezeigt. Die schematische Topologie präsentiert die konservierten β -Faltblätter (B1 bis B3) und die konservierten α -Helices (A1 bis A5). BTB-Zink-Finger Proteine haben Erweiterungen ($\alpha 1$ und $\beta 1$) am N-Terminus und Skp1 besitzt zusätzliche α -Helices ($\alpha 7$ und $\alpha 8$) am C-Terminus (Stogios et al., 2005).

Bisher sind 183 Proteine mit BTB-Domänen im menschlichen Genom identifiziert worden: 43 BTB-Zink-Finger, 49 BTB-BACK-Kelch, 2 MATH-BTB, 2 Skp1, 3 ElonginC, 27 T1, 24 Proteine mit anderer Architektur (z.B. RhoBTB) und 32 einzelne BTB Domänen. Die erste BTB Domäne der RhoBTB Proteine beinhaltet eine Insertion von 115 Aminosäuren zwischen A2 und B3, während die zweite BTB Domäne eher typisch ist und den BTB-BACK-Kelch Proteinen sehr ähnelt. BTB Proteine mit zusätzlichen Domänen wie Zink-Finger, KELCH, MATH und Rho sind untereinander mehr verwandt als zu Skp1, ElonginC und T1. Es wird postuliert, dass die meisten längeren BTB Domänen Dimere ausbilden und mit dem ersten β -

Faltblatt (β 1; Abb. 1.5) ein Interdimer in größeren Komplexen bilden können (zusammengefasst in Stogios et al., 2005).

1.4.3 Cullin-abhängige Ubiquitin-Ligasen

Cullin-abhängige Ligasen (*cull*, engl. Ausschuss, Abfall) sind an der Markierung von Proteinen für den Abbau durch das 26S-Proteasom beteiligt.

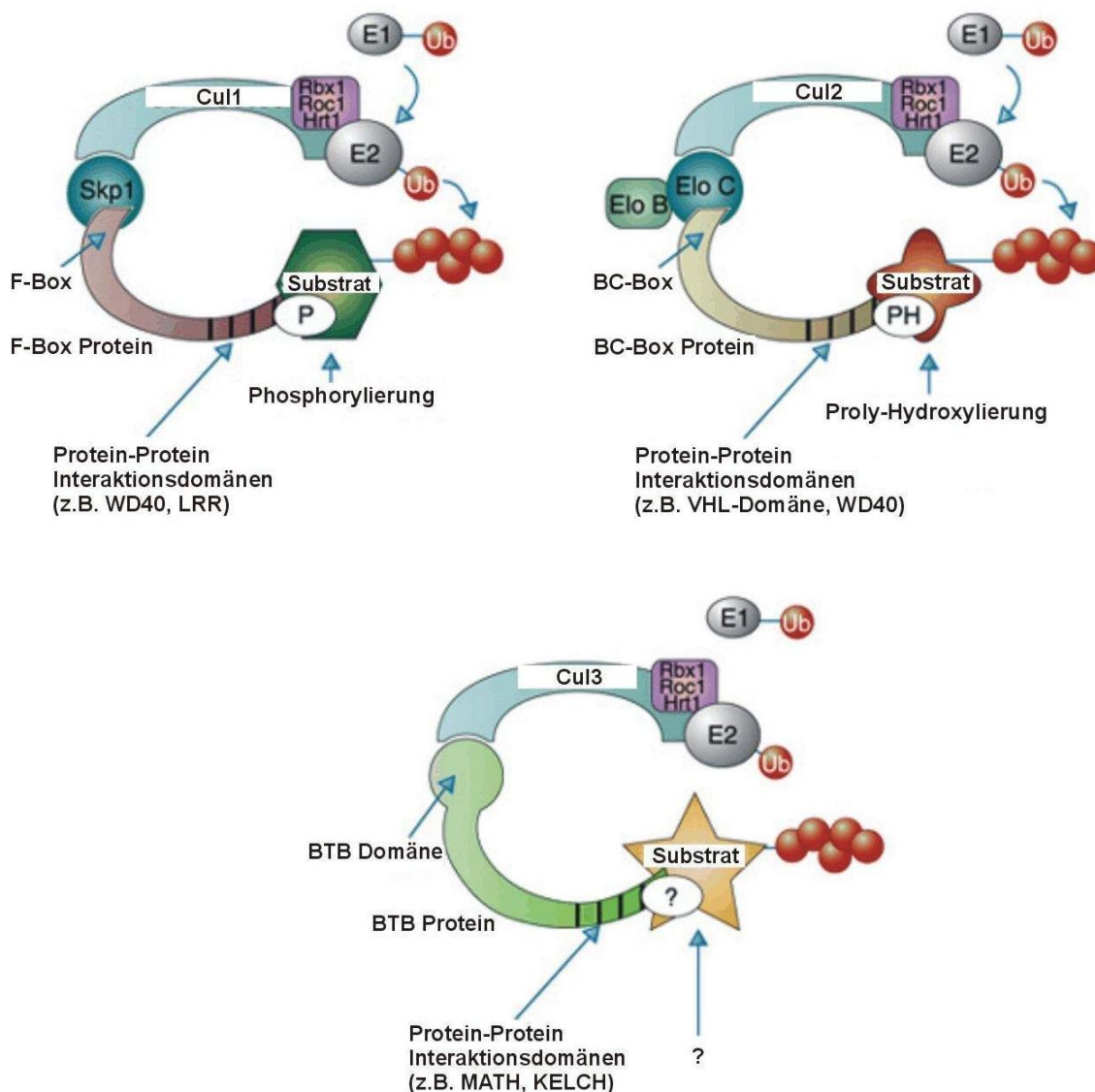


Abbildung 1.6 Unterschiedliche Cullin-RING-Finger-Ligasekomplexe. Der katalytische Kern der Cullin-RING-Finger-Ligasen (CRL) besteht aus einem RING-Faktor (HRT1/Rbx1/Roc1) und einem Mitglied der Cullin Familie. Skp1-Cullin1-F-Box-Komplexe rekrutieren ihre Substrate mittels des Adaptorproteins Skp1 durch ein F-Box Protein. Hingegen erkennen von Hippel Lindau-ElonginB/C-Cullin2 Komplexe ihre Substrate mit Hilfe eines SOCS-Box Proteins und ElonginB/C als Mediator. Cullin3 CRLs rekrutieren ihre Substrate mit BTB Domänen Rezeptorproteinen (modifiziert nach Krek, 2003).

Säugetiere besitzen sieben verschiedene Culline (Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A, Cul4B, Cul5 und Cul7). Die Sequenzhomologie ist am C-Terminus in der so genannten Cullin Domäne am größten. Culline gehören zur Klasse der RING-Finger-Ligasen (*really interesting new gene*; Freemont et al., 1991; Lovering et al., 1993). Sie vermitteln durch Bindung und räumliche Annäherung von E2-Enzym und Substrat die direkte Ubiquitin-Übertragung vom E2-Enzym auf das Zielprotein (Abb. 1.6). Cullin-Ligasen sind durch Neddylierung reguliert und benötigen den RING-Faktor HRT1/Rbx1/Roc1. Es sind multimere oder heterodimere Komplexe mit RING-Finger-Ligase-Aktivität aus bis zu zwölf Untereinheiten bekannt (Jackson et al., 2000). Dazu gehören der „Skp1-Cullin1-F-Box“ (SCF)-Komplex und der „von Hippel Lindau-ElonginB/C-Cullin2“ (VBC-Cul2)-Komplex. Die Substraterkennung erfolgt bei SCF-Komplexen über F-Box Proteine (Bindung über Elongin A/Skp1) und bei VBC-Cul2-Komplexen über SOCS (*suppressor of cytokine signalling*)-Box-Proteine (Bindung über Elongin B/C). Kürzlich wurden RING/Cullin3/BTB-Komplexe definiert, wobei die BTB Domäne – entsprechend Skp1 - Cullin3 direkt bindet und gleichzeitig die Substraterkennung durch weitere Domänen bewirkt (Geyer, 2003; Furukawa et al., 2003; Pintard et al., 2003). Wie vorher erwähnt (1.4.2), zeigt die BTB Domäne eine ähnliche Faltung wie Skp1 und ElonginC Proteine auf (Stogios et al., 2005).

1.5 Rho GTPasen in der Tumorentstehung

Signalmoleküle spielen durch Aktivierung (Onkogene) oder durch Hemmung (Tumorsuppressorgene) eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Progression von bösartigen Tumoren. Ras ist das best untersuchte Onkogen in menschlichen Karzinomen. In menschlichen Tumoren zeigen 25-30% der Ras Proteine eine mutierte Version (meist K-Ras, gefolgt von N-Ras, am wenigsten H-Ras). Ras Onkogene besitzen eine Aminosäuresubstitution, die ihre GTP-Hydrolyse verringert und somit zu konstitutiver Aktivierung der Proteine führt – selbst in Abwesenheit extrazellulärer Signale (Bos, 1989). Rho Proteine haben neben der Regulation des Zytoskeletts auch Einfluss auf die Tumorigenese, entweder direkt über Effekte auf das Zytoskelett oder indirekt durch Veränderungen der Gentranskription. Rho GTPasen können die invasiven Eigenschaften von Tumorzellen beeinflussen, die Angiogenese unterstützen, die Motilität erhöhen und an Metastasierung in verschiedenen Organen impliziert sein (Aznar et al., 2001; Sahai et al., 2002; Gomez

del Pulgar et al., 2005). Dies könnte im Zusammenspiel mit Ras erfolgen. Bisher sind nur für die Rho GTPasen RhoH und Rac1 tumorassoziierte Mutationen nachgewiesen worden (Tab. 1.1). Für andere Proteine sind alternierende Expressionslevel, in vielen Fällen Überexpressionen, bekannt (Malliri und Collard, 2003).

Tabelle 1.1 Mutierte und deregulierte Rho GTPasen in humanen Tumoren.

	RhoC	RhoA	Rac1	Rac2	Rac2	Cdc42	Rnd1/ RhoG	Genet. Abw.
Brust	Ü, A	Ü	Ü			Ü		Rac1b
Melanom	RNA	A	A		A	A	Ü	
Epithelkarzinom	RNA	Ü, A	Ü	Ü		Ü		
Kolon		Ü, A	Ü, A			Ü		Rac1b
Pankreas	Ü	A						
Lunge	Ü, A	Ü, A	Ü					
Testis		Ü	Ü			Ü		
Ovar	Ü, A	Ü, A						
Magen	Ü	Ü, A	Ü, A					
Leber		Ü, A						
Uterus		RNA						
Prostata		A						
Niere			A					
Neuroblastom		A						
Blut	Ü	Ü, A						
Leukämie		A						
Sarkom		A						
Lymphom	RNA*							RhoH

Der Buchstabe Ü repräsentiert Überexpression des Proteins, A erhöhte Aktivität und RNA zeigt an, dass der mRNA-Level erhöht ist, aber keine Informationen über den Proteinlevel bestehen (*Hodgkin). Genetische Veränderungen im Bezug auf Rho GTPasen in spezifischen Tumoren sind in der letzten Spalte vermerkt (modifiziert nach Gomez del Pulgar et al., 2005).

In einigen Tumoren findet die Überexpression auf mRNA-Level, in anderen nur auf Proteinlevel statt. Es konnte gezeigt werden, dass Überexpression bzw. erhöhte Aktivitäten vieler Rho, Rac und Cdc42 Proteine in humanen Tumoren verglichen mit normalen Gewebe vorliegen (Tab. 1.1) und eine erhöhte Expression von Rac1b in kolorektalen Karzinomen (Jordan et al., 1999) und in Brusttumoren auftritt (Gomez del Pulgar et al., 2005). RhoB gilt als Tumorsuppressor, da das Protein in Tumorprogression hinunterreguliert ist und entgegengesetzte Effekte als andere Rho GTPasen aufzeigt (Prendergast, 2001). Kürzlich konnte eine Verbindung zwischen dem Tumorsuppressor Merlin und Rho GTPasen hergestellt werden: Überexpression von Merlin blockiert die Rac1-induzierte Transformation und es ist eine erhöhte Rac Aktivität in Fibroblasten mit Merlindelation festzustellen. Weitere Komponenten der

Rho-abhängigen Signalwege, wie z.B. die Rho Regulatoren Dbl, Ost, Ect-2 und Vav-1 wurden als Proto-onkogene identifiziert. Zusammen mit ihren Rho GTPasen führen sie zur Entwicklung von Metastasen in Lunge, Milz und Lymphknoten (Hoffmann und Cerione, 2002). In humanen Tumoren sind auch Rho GEFs (Tiam-1, GEF720), GAPs (DLC-1) und GDIs impliziert (zusammengefasst in Gomez del Pulgar, 2005). Es gibt indirekte Hinweise, dass die Effektoren PAK-1 und ROCK die Tumordinvasivität beeinflussen (Li und Lim, 2003).

Eine Veröffentlichung postuliert RHOBTB2 als einen Kandidaten für Tumorsuppression (Hamaguchi et al., 2002). Die Autoren zeigten, dass RhoBTB2 (DBC2, *deleted in breast cancer*) in 3,5% Brusttumoren homozygot deletiert ist. In einer Brust-Tumorzelllinie mit RHOBTB2 Gendeletion führte die induzierte Überexpression dieses Gens zu einer Wachstumsreduktion. In vielen menschlichen Tumoren ist die RHOBTB2 Region häufig mit LOH (Heterozygotieverlust, *loss of heterozygosity*) assoziiert. Weiterhin wurden diverse Mutationen in dem RHOBTB2 Gen in Brust- und Lungentumoren identifiziert und Mutationsanalysen von RHOBTB2 zeigten zwei somatische Mutationen in Brusttumoren. In 58% Brust-, 50% Lungen- und 75% Harnblasentumorzellen war der entsprechende mRNA-Level erniedrigt (Knowles et al., 2005). In einer jüngsten Veröffentlichung wurde auch RHOBTB1 als Tumorsuppressorgen vorgeschlagen. Im RHOBTB1-Lokus wurde hohe und eindeutig ausgeprägte LOH sowie eine verminderte Expression in Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom gezeigt (Beder et al., 2005). Jedoch wurde bisher keine pathogenetische Mutation von RHOBTB1 gefunden. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit könnten alle RhoBTB Proteine als Tumorsuppressorgene agieren.

1.6 Pathologische Auswirkungen von Abberationen in Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexen

Durch die Komplexität und Vielzahl an Substraten ist es nicht überraschend, dass Aberrationen in der Ubiquitinierung an pathologischen Auswirkungen – bis zur Krebsentstehung – beteiligt sind (zusammengefasst in Guardavaccaro und Pagano, 2004). Cullin1 ist für den Zellzyklus notwendig. In Mäusen resultiert der Verlust von Cullin1 in früher embryonaler Letalität und wird auf die Substrate des SCF-Komplex zurückgeführt: Skp2, Fbw7 und β -Trep (*β -transducin repeat-containing protein*). Das Skp2 Protein interagiert mit den Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitoren p27, p21 sowie

p57, Fbw7 mit Zyklin E, Notch1/4 sowie dem Onkogen c-Myc, β -Trep mit dem NF- κ B Inhibitor I κ B, β -Katenin sowie Emi1 und reguliert dessen Abbau. Cullin2 wirkt als positiver Zellzyklusregulator und bindet eine große Anzahl an Substratrezeptoren: SOCS-Box Proteine und BC-Box-beinhalten Proteine. Eine Prädispositionsmutation im von Hippel Lindau Tumorsuppressor unterbindet die Formation des Cul2-abhängigen Ligase-Komplexes (Liakopoulos et al., 1999; Lisztwan et al., 1999). Weitere Substrate von VCB-Cul2-Komplexen sind Med8, welches die Transkription der RNA Polymerase aktiviert, und Socs1, ein SH2-beinhaltenes Protein (*Src homology 2*), das Zytokine und Wachstumsfaktoren negativ reguliert. Cullin5 Komplexe mit Roc1, ElonginB/C können ebenfalls mit BC-Box-beinhaltenen Proteinen assoziieren: Leucin-reiches Muf1, Socs, ElonginA und WSB-1. Deletion von Cullin3 ist in Mäusen letal mit Auswirkungen in embryonalen Geweben (Singer et al., 1999). Es wurde Zyklin E als Substrat entdeckt, und mit kürzlich postulierten BTB Domänen-beinhaltenen Proteinen vervielfacht sich die Anzahl der Substrate. Cullin4A wird in 47% primären Brusttumoren überexprimiert und wird in hepatozellulären Karzinomen amplifiziert. Es wurde weiterhin gezeigt, dass Cul4A an Nukleotidaustauschreparatur beteiligt ist. Zusammenfassend kann eine defekte oder zu aktive Degradierung zur Tumorentstehung beitragen. Störungen in der Ubiquitinierung und im proteasomalen Abbau sind auch an neurologischen Erkrankungen, wie z. B. Morbus Parkinson, aber auch Autoimmunerkrankungen und verschiedenen Erbkrankheiten ursächlich beteiligt (Glickman und Ciechanover, 2002, Guardavaccaro et al., 2004).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist 1) die Lokalisation der RhoBTB Proteine im Gewebe, 2) ihre Beteiligung am Ubiquitin-Konjugationssystem und 3) ihre Rolle in der Tumorentstehung zu untersuchen.

Hierzu soll einerseits die Expression der RhoBTB Proteine in verschiedenen Geweben mit immunhistochemischen Techniken, zum anderen die subzelluläre Lokalisation und Verteilung der Proteine in der Zelle näher untersucht werden. Weiterhin sollen die Signaltransduktionswege identifiziert werden, in denen die Proteine involviert sind. Während dieser Arbeit konnte in Veröffentlichungen die Interaktion von BTB Domänen beinhaltenden Proteinen mit einem Cullin3-Ring-Finger-Ligasekomplex gezeigt werden. Ob dies auch für die RhoBTB Proteine zutrifft soll mit der Hefe-Hybrid-Technik und Koimmunpräzipitation in dieser Arbeit aufgeklärt werden. Zudem werden weitere Aspekte der Ubiquitinierung und des Abbauprozesses untersucht, um mehr Einblicke in die physiologische Rolle der RhoBTB Proteine zu bekommen. BTB Domänen sind in homo- und heteromeren Interaktionen involviert, welche ebenfalls mit der Hefe Hybrid-Analyse für die RhoBTB Proteine aufgeklärt werden sollen. Ein Screening mit RhoBTB3 als Köder zeigte bereits drei potentielle Bindungspartner. Diese Interaktionen sollen mit biochemischen Methoden wie GST-Präzipitation und Koimmunpräzipitation bestätigt werden. In weiteren Hefe Hybrid- Experimenten sollen die interagierenden Domänen identifiziert werden, sowohl die einzelnen Domänen der RhoBTB Proteine als auch die der potentiellen Kandidaten. Die Rolle der RhoBTB GTPasen in der Tumorentstehung, insbesondere die Hypothese der Tumorsupressorfunktion, soll mit Hilfe von Northern Blot Analysen und quantitativer PCR mit Tumorproben im Vergleich zu gesundem Gewebe untersucht werden.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit nicht beschriebenen Methoden und verwendeten Puffer bzw. Lösungen wurden aus Sambrook et al. (2001) übernommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Material

2.1.1 Labormaterial

Corexröhrchen, 15 ml	Corex
Deckgläschen, Ø 15 mm	Assistent
Einfrierröhrchen, 1 ml	Nunc
Einweg-Pipetten, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner
Einweg-Pipettenspitzen	Greiner
Finnpipette	Thermo Biolabs
Gewebekulturflaschen, 75 cm ²	Nunc
Hybridisierungsröhren	VWR Merck
Hyperfilm ECL, 18x24 cm	Amersham
Hyperfilm MP, 18x24 cm	Amersham
Kanülen	Microlance
6-Loch Platte	Nunc
3MM Filterpapier	Whatman
Multistepper	Merck
Nitrocellulose-Transfermembran	Schleicher und Schuell
Nitrocellulose-Filter	Schleicher und Schuell
Objektträger	Assistent
Pap Pen	Dako
Parafilm	American National Can
PCR Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Biozym
Petrischalen, Ø 90 mm	Greiner
Pipetten, 1-10 µl, 1-20 µl, 20-200 µl und 200-1000 µl	Gilson
Plastikküvetten	Greiner
Quarzküvette	Hellma
Röhrchen Typ 2095, 15 ml	Falcon
Röhrchen Typ 2070, 50 ml	Falcon

Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,2 ml	Sarstedt
Spritzen, 1 ml	Terumo
Sterilfilter, 0,45 µm	Gelman Science
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugensäulchen ZebaSpin	Pierce

2.1.2 Geräte

Blotkammer Trans Blot, Semi-Dry	Biorad
Eismaschine	Ziegra
Fluoreszenzmikroskop DMR	Leica
Heizblock DIGI-Block JR	NeoLab
Heizblock Dry-Block DBx20	Techne
Homogenisator Dounce, 10 ml und 40 ml	Braun
Hybridisierungsöfen	Hybaid
CO ₂ -Inkubator, BBD 6220, BB 6220	Heraeus Instruments
Inkubator, Mikrobiologischer	Heraeus Instruments
Inkubator, Hefe	LTE Scientific
Inkubator mit Schüttler	Kuehner
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments
Laser Raster Mikroskop TCS-SP	Leica
Lichtmikroskop DMR	Leica
Lichtmikroskop IX70, CK2 und CH30	Olympus
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph
Megakassette mit Kunststoffdeckel	Medite
Mikrotom HM 355S	Microm
Mikrowellengerät	Samsung
Paraffineinbettungsmaschine Citadel 1000	Shandon
Paraffin-Einbettungssystem	Medite
PCR-Maschine	MWG Biotech
Einbettungsschalen (Peel-A-Way)	Polysciences
Peristaltikpumpe P-1	Pharmacia Biotech
pH-Meter pH526	WTW

Phosphorimager 445si	Molecular Dynamics
Rotoren Typ JA-10 und JA-25.50	Beckmann
Rotoren Typ SS-34 und SLA-1500/3000	Sorvall
SDS-PAGE-System Mini-Protean	Biorad
SDS-PAGE-System SE 600	Hoefer
Sonifiziergerät, ultra Turrax T25	IKA Labortechnik
Spannungsverstärker Power Pac 200 und 300	Biorad
Spektralphotometer Typ Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments
Thermocycler MJ PTC 200	MJ Research
Tiefkühlschränke und -truhen (-20°C)	Liebherr, Siemens
Tiefstühltruhen (-80°C)	Nunc
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf
Tischzentrifuge Sigma B	Sigma
Ultraschallgerät UP200S	Dr. Hielscher GmbH
UV-Auflichtmonitor TFS-35 M	Faust
UV-Transilluminator	MWG Biotech
Vortex Reax Top	Heidolph
Waage	Kern
Wasserbäder	GFL
X-Ray Entwicklermaschine FPM-100A	Fujifilm
Zentrifuge Beckmann Avanti J25	Beckmann
Zentrifuge Sorvall RC 5C plus	Sorvall

2.1.3 Kits

High Pure Plasmid Purification Kit	Roche
High Pure PCR Purification Kit	Roche
Lipofectamin 2000	Invitrogen
µMacs TM Epitop Tag Protein Isolation Kit	Mitenyi Biotec
Nucleobond AX 100	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
pGEM-Teasy-Vector System	Promega
Qiagen Midi-Präparation	Qiagen
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche

RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen
SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Western-Blot Recycling Kit	Chemicon

2.1.4 Puffer und andere Lösungen

Puffer und Lösungen, die hier nicht verzeichnet sind, werden unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

PBS (10x, pH 7,2):

10 mM KCl
10 mM NaCl
16 mM Na₂HPO₄
32 mM KH₂PO₄

NCP (10x, pH 8,9):

12,1 g Tris
87,0 g NaCl
5 ml Tween 20
2,0 g Natriumacid
mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

SSC (20x):

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat

TAE-Puffer (50x):

1 M Tris/HCl, pH 8,0
950 mM Essigsäure
50 mM EDTA

TBE-Puffer (5x):

455 mM Tris/HCl, pH 8,0
455 mM Borsäure
10 mM EDTA

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	National Diagnostics
Agar-Agar (BRC-RG)	Biomatic
Agarose (SeaKem [®] LE)	Cambrex
5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phtalazindion (Luminol)	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Promega
5-Brom-4-Chlor-3-Indazol- β -Galactopyranosid	Roth
Bromphenolblau	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
Chloroform	Riedel-de Haen
Chloroquin	Sigma
Coomassie Brillant-Blau R250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
dNTP's	PeqLab
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Essigsäure	Riedel-de Haen
Ethanol	Riedel-de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
FBS	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Formamid	Merck
Gluthation Sepharose [™] 4B	Amersham
Glutamin	Biochrom
Glycerin	Riedel-de Haen
Glyceringelatine	Roche

Glycin	Degussa
Heringssperma-DNA	Roche
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Loewe Biochemica
Lachssperma-DNA	Fluka
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Lipofectamine TM 2000	Invitrogen
Lithiumacetat	Sigma
Magnesiumchlorid	Fluka
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haen
Milchpulver	Supermarkt
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen
4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (NBT)	Roche
Nukleotide	Sigma
Paraffin Nr.3/5	Richard-Allan Scientific
Phenol	Roth
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma
Polyethylenglykol 4000 (PEG)	Merck
Ponceau-S Konzentrat	Sigma
Protein-A-Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech
Pyruvat	Sigma
Salzsäure, 32%ig	Fluka
Sephadex G50	Pharmacia
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck

Triton X-100 (Octylphenylpoly[ethylenglykolether])	Merck
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Roth
Wasserstoffperoxid, 30%ig	Merck
Yeast Nitrogen Base	Difco

Alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.A. Qualität wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva, Sigma und Riedel-de Haen bezogen.

Radioaktive Chemikalien:

Adenosin 5'-[α - ³² P]-triphosphat (10 mCi/ml)	Amersham
---	----------

2.1.6 Enzyme, Antikörper und Inhibitoren

2.1.6.1 Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase	Roche
Deoxyribonuklease I (DNase I)	Roche
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Lysozym	Sigma
Klenow-Fragment (DNA-Polymerase I)	Roche
Restriktionsendonukleasen	Amersham, New England Biolabs, Jena Biosciences
Ribonuklease A (RNase A)	Roche
T4-DNA-Ligase	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Roche
Trypsin	Biochrom

2.1.6.2 Antikörper

Primäre Antikörper:

anti-Arp3 Antikörper	M. Plomann
anti-Cullin3 Antikörper	J. Singer
anti-Digoxigenin AP	Boehringer
anti-Flag Antikörper	Acris
anti-GFP Antikörper mAk K3-184-2	A.A. Noegel

anti-GM130 Antikörper	P. Aspenström
anti-GST Antikörper	Amersham
anti-Mannosidasell	V. Rybakin
anti-myc Antikörper	A.A. Noegel, Biomol
anti-PDI (Protein-Disulfid-Isomerase) Antikörper	M. Plomann
anti-RhoBTB3 Antikörper	F. Rivero

Sekundäre Antikörper:

Ziege anti-Kaninchen IgG, Alexa 568 Konjugat	Molecular Probes
Ziege anti-Kaninchen IgG, Peroxidase Konjugat	Sigma
Ziege anti-Maus IgG, Alexa 568 Konjugat	Molecular Probes
Ziege anti-Maus IgG, Peroxidase Konjugat	Sigma

Die Antikörper wurden gemäß der Angaben der Hersteller in PBS/5% FBS verdünnt. Hybridomaüberstände wurden in der Immunfluoreszenz unverdünnt und im Western-Blot 1:5 verdünnt eingesetzt.

2.1.6.3 Inhibitoren

Benzamidin	Sigma
Complete-Mini [®] Inhibitoren Cocktail, EDTA-frei	Roche
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Ribonuklease Inhibitor (RNAsin)	Promega
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Proteasom Inhibitor MG132	Sigma

2.1.6.4 Antibiotika

Ampicillin	Grünenthal
Chloramphenicol	Sigma
Kanamycin	Sigma
Tetracyclin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom

2.1.7 Vektoren

Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Plasmidvektoren.

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmidvektoren.

Vektor	Charakteristika	Referenz
pEGFP-C1	4,7 kb, Kanamycin-Resistenz, zur transienten Proteinexpression in Säugetierzellen verwendet, GFP N-Terminal	Clontech
pGADT7	8,0 kb, Ampicillin-Resistenz, zur Expression in Hefe verwendet, GAL4-Aktivierungsdomäne, LEU2-Selektionsmarker	Clontech
pGBKT7	7,3 kb, Kanamycin-Resistenz, zur Expression in Hefe verwendet, GAL4-Bindungsdomäne, TRP1-Selektionsmarker	Clontech
pAS2-1, pAS2-1+1, pAS2-1+2, pAS2-1b	8,4 kb, Ampicillin-Resistenz, zur Expression in Hefe verwendet, GAL4-Bindungsdomäne, TRP1-Selektionsmarker	Clontech (veränderte Versionen)
pACT2, pACT2+1, pACT2+2	8,1 kb, Ampicillin-Resistenz, zur Expression in Hefe verwendet, GAL4-Aktivierungsdomäne, LEU2-Selektionsmarker	Clontech (veränderte Versionen)
pGEX-2T, pGEX-4T-1, pGEX-4T-1NTEV	5,0 kb, Ampicillin-Resistenz, zur bakteriellen Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusion verwendet	Amersham Pharmacia Biotec
pCDNA3myc	5,4 kb, Ampicillin-Resistenz, zur transienten Proteinexpression in Säugetierzellen verwendet, myc N-Terminal	J. Singer
pRK5Flag	5,4 kb, Ampicillin-Resistenz, zur transienten Proteinexpression in Säugetierzellen verwendet, Flag N-Terminal	P. Aspenström
pRK5myc	5,4 kb, Ampicillin-Resistenz, zur transienten Proteinexpression in Säugetierzellen verwendet, myc N-Terminal	P. Aspenström
pQE30	3,4 kb, Ampicillin-Resistenz, zur bakteriellen Expression von 6xHis-Tag-Fusion verwendet	Qiagen

2.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die synthetisch hergestellten Oligonukleotide.

Tabelle 2.2: Synthetisch hergestellte Oligonukleotide. Die Erkennungssequenz für die jeweils angegebene Restriktionsendonuklease ist unterstrichen dargestellt. Sequenzen zeigen 5'-3'-Orientierung. Die Synthese erfolgte durch die Firma Sigma-Ark.

Gen	Bezeichnung	Sequenz
MmRhoBTB1	MmRhoBTB1-fwd/BamHI	<u>ggatcc</u> atggactctgacatggac
MmRhoBTB1	MmBTB1-GTPase-rev/EcoRI	<u>gaattc</u> attccagaactgcaggt
MmRhoBTB1	MmBTB1-B2-rev/BamHI	<u>ggatcc</u> gctcacaccactgacagcggc
MmRhoBTB1	MmBTB1-PB1-fwd/BamHI	<u>ggatcc</u> atgctgcagttctgaaatcccac
MmRhoBTB1	MmRhoBTB1-C-rev/BamHI	<u>ggatcc</u> ctcaggcgacagctggggaagc
MmRhoBTB1	MmRhoBTB1-C-fwd/EcoRI	<u>gaattc</u> aaggccgctgtcagtggtg
MmRhoBTB1	MmBTB1-Cd1H-fwd/EcoRI	<u>gaattc</u> tgccaatcagctagctgcctggtg
MmRhoBTB1	MmBTB1-CdHE-rev/BamHI	<u>ggatcc</u> ctcagggccagcggtgccgctcaaag
MmRhoBTB1	MmRhoBTB1-dC-rev/BamHI	<u>ggatcc</u> ctcagtgctgttcagcgccag
HsRhoBTB1	BTB1-B1-fwd	ccaaaagcccctccaccgg
HsRhoBTB1	BTB1-B1-rev	cctggtcatgaaggcttc
HsRhoBTB2	HsRhoBTB2-fwd/BamHI	<u>ggatcc</u> atggattctgacatggattatgaa
HsRhoBTB2	HsBTB2-rev/BglII	<u>agatct</u> ccaccgcccgtgggctgcctccgag
HsRhoBTB2	HsRhoBTB2-rev/EcoRI	<u>gaattc</u> ctcagaccacagccgaggaggag
HsRhoBTB2	HsBTB2-PB1-fwd/BamHI	<u>ggatcc</u> atgctgcagttctggaagtcccacctc
HsRhoBTB2	HsBTB2-GTPase-rev/EcoRI	<u>gaattc</u> ctcagaggtgggactccagaactgcag
HsRhoBTB2	BTB2-B1-fwd	cccaagccaccgccccg
HsRhoBTB2	BTB2-B1-rev (A)	ttagtccatcttcaccaccatcagcc
HsRhoBTB2	BTB2-B1-rev (B)	ggcatgaagccctcattg
HsRhoBTB2	HsBTB2-C-fwd/XhoI	<u>ctcgag</u> acatcgatgggatgtcctgtattc
HsRhoBTB2	HsBTB2-P647T-fwd	gtgccgaagttcaccagagacatgaag
HsRhoBTB2	HsBTB2-P647T-rev	ttcatgtctctggtgaactgcgccac
MmRhoBTB3	MmBTB3-GTPase-rev/EcoRI	<u>gaattc</u> tctactgtctctgatttaaggg
MmRhoBTB3	MmBTB3-B2-rev/XhoI	<u>ctcgag</u> tcagttcatggaggccagctccctgct
MmRhoBTB3	MmBTB3-fwd/BglII	<u>agatct</u> atgtccatccacatcggtggctgggg
MmRhoBTB3	MmBTB3-rev/EcoRI	<u>gaattc</u> ctcacatgactaacagcgacattccg
MmRhoBTB3	MmRhoBTB3-fwd/HindIII	<u>aagctt</u> atgtccatccacatcggtggctgggg
MmRhoBTB3	MmBTB3-B1-rev/XhoI	<u>ctcgag</u> tcagagagacgtattataaaaccacag

MmRhoBTB3	RBTB3-Rho-fwd/EcoRI	<u>gaattc</u> atgtccatccacatcgtggcggtg
HsRhoBTB3	HsBTB3-fwd/BglII	<u>agatct</u> atgtccatccacatcgtggcgctgg
HsRhoBTB3	HsBTB3-GTPase-rev/EcoRI	<u>gaattc</u> atttaaggcttgaatcataaaatactc
MmE2 (Ubc)	E2-fwd/EcoRI	<u>gaattc</u> atggcagccaccacaggctcgggag
MmE2 (Ubc)	E2-rev/XhoI	<u>ctcgag</u> ctaattgctgtaacactgtccttccgg
HsCullin3	HsCul3-fwd	atgtcgaatctgagcaaagg
HsCullin3	HsCul3-rev	aaaatttctggctttccatc
HsCullin3	HsCul3-fwd/XmaI	<u>ccggg</u> catgtcgaatctgagcaaaggcacg
HsCullin3	HsCul3-rev/XhoI	<u>ctcgag</u> ttatgctacatattgtgtatactttgcg
HsCullin4A	HsCul4A-fwd/XmaI	<u>ccggg</u> catctcagaggaagatctggaatcc
HsCullin4A	HsCul4A-rev/BamHI	<u>ggatcc</u> tagtgtttcatgaaggggaaccgtctg
HsCullin5	HsCul5dN41-fwd/BamHI	<u>ggatcc</u> atctgtttcggatgtgcatgcagctctg
HsCullin5	HsCul5-rev/XhoI	<u>ctcgag</u> tgccatataatgaaagtgtgattgatatcaga
HsRhoBTB1	Primer Set RhoBTB1	Super Array
HsRhoBTB3	Primer Set RhoBTB3	Super Array
HsCullin 3	Primer Set CUL3	Super Array
HsGAPDH	Primer Set GAPDH	Super Array
MmRhoBTB1	mBTB1-s (Dig)	cgcaccgcatttacctcgctacctcttcttccaaattcta
MmRhoBTB1	mBTB1-a (Dig)	tagaatttgaagaagaggtagcggagtaaatgcggtg
MmRhoBTB2	mBTB2-s (Dig)	ctcctcctccaaattctatgacttattcctcatggacctg
MmRhoBTB2	mBTB2-a (Dig)	caggtccatgaggaataagtcatagaattggaggaggag
MmRhoBTB3	mBTB3-s (Dig)	atgtccatccacatcgtggcggtggggaacgagggcgaca
MmRhoBTB3	mBTB3-a (Dig)	tgtcgccctcgttcccaacgccacgatgtggatggacat

2.1.9 Konstrukte

Die in Tabelle 2.3-2.5 aufgeführten Konstrukte wurden für die vorliegende Arbeit hergestellt. Dabei sind die verwendeten Vektoren, die klonierten DNA-Fragmente und die codierten Aminosäure-Positionen angegeben. Dabei bezeichnet B1 die BTB1 Domäne, B2 die BTB2 Domäne und C die C-terminale Domäne der RhoBTB Proteine. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

2.1.9.1 Plasmide für das „Yeast Two Hybrid“-System

Tabelle 2.3: Klonierte Konstrukte für das Hefe Hybrid-System.

Vektor	Insert	Aminosäuren
pACT2+2	MmRhoBTB1	1-695
pACT2+2	HsRhoBTB2	1-728
pACT2+2	MmRhoBTB3-B1B2C	254-611
pACT	MmRhoBTB3-B1B2	254-518
pACT2+2	MmRhoBTB3-B1	254-388
pACT	MmRhoBTB3-B2	420-518
pGADT7	Cullin1	1-752
pGADT7	Cullin2	1-745
pGADT7	Cullin3	1-768
pGADT7	Cullin3 Δ N41	42-768
pGADT7	Cullin4A	1-707
pGADT7	Cullin5	1-780
pGADT7	E2 (Ubc)	1-147
pACT2+2	Roc1 (Rbx)	1-108
pAS	MmRhoBTB1-B1B2C	245-695
pAS1+2	HsRhoBTB2	1-728
pAS21+2	MmRhoBTB3	1-611
pAS2-1b	HsRhoBTB2-GTPase	1-211
pAS2-1b	HsRhoBTB2-B1B2C	266-728
pAS2-1b	MmRhoBTB3-B1	254-388
pAS2-1b	MmRhoBTB3-B2	420-518
pAS2-1b	MmRhoBTB3-C	531-611
pAS2-1b	MmRhoBTB3-C Δ CAAX	531-607

Darüber hinaus wurden die folgenden Konstrukte verwendet:

pACT2/Arp3	F.Rivero
pACT2/Muf1	F.Rivero
pACT2/Zap3	F.Rivero
pAS2-1b/MmRhoBTB3-B1B2C	F.Rivero
pAS/HsCdc42 (nicht mutiert)	F.Rivero
pAS/HsCdc42-G12V (konstitutiv aktiv)	F.Rivero

pAS/HsCdc42-T17N (dominant negativ)	F.Rivero
pAS/HsRhoA (nicht mutiert)	F.Rivero
pAS/HsRhoA- G12V (konstitutiv aktiv)	F.Rivero
pAS/HsRhoA-(dominant negativ)	F.Rivero
pAS/HsRac1 (nicht mutiert)	F.Rivero
pAS/HsRac1- G12V (konstitutiv aktiv)	F.Rivero
pAS/HsRac1-(dominant negativ)	F.Rivero

2.1.9.2 Plasmide für Überexpressionen in Säugerzellen

Tabelle 2.4: Klonierte Konstrukte für Überexpressionen in Säugerzellen.

Vektor	Insert	Aminosäuren
pEGFP-C1	MmRhoBTB1 Δ C	1-592
pEGFP-C1	MmRhoBTB1-C	583-695
pEGFP-C1	MmRhoBTB1-C Δ 1.H	607-695
pEGFP-C1	MmRhoBTB1-C Δ HE	538-650
pEGFP-C1	MmRhoBTB1-C Δ E	538-678
pEGFP-C1	HsRhoBTB2	1-728
pEGFP-C1	HsRhoBTB2CP647T	1-728 (P647T)
pEGFP-C1	HsRhoBTB3-GTPase	1-200
pRK5myc	HsRhoBTB2-GTPase	1-211
pRK5myc	HsRhoBTB2-B1B2C	266-728
pRK5myc	HsRhoBTB3	1-611
pRK5myc	MmRhoBTB3-GTPase	1-204
pcDNA3myc	E2 (Ubc)	1-147

Darüber hinaus wurden die folgenden Konstrukte verwendet:

pEGFP-C1/MmRhoBTB3	F. Rivero
pEGFP-C1/MmRhoBTB3-GTPase	F. Rivero
pEGFP-C1/MmRhoBTB3-B1B2C	F. Rivero
pEGFP-C1/MmRhoBTB3-B1B2	F. Rivero
pEGFP-C1/MmRhoBTB3-B1	F. Rivero
pEGFP-C1/MmRhoBTB3-B2	F. Rivero
pEGFP-C1/MmRhoBTB3-C	F. Rivero
pEGFP-C1/MmRhoBTB3- Δ CAAX	F. Rivero

pRK5myc/HsRhoBTB2	P. Aspenström
pRK5Flag/HsRhoBTB2	P. Aspenström
pRK5Flag/HsRhoBTB3	P. Aspenström
pcDNA3myc/Cullin1	Y. Xiong
pcDNA3myc/Cullin2	Y. Xiong
pcDNA3myc/Cullin3	Y. Xiong
pcDNA3myc/Cullin3 Δ N41	Y. Xiong
pcDNA3myc/Cullin4	Y. Xiong
pcDNA3myc/Cullin5	Y. Xiong

2.1.9.3 Plasmide für Bakterienexpressionen

Tabelle 2.5: Klonierte Konstrukte für Bakterienexpressionen.

Vektor	Insert	Aminosäuren
pGEX-2T	MmRhoBTB1-GTPase	1-211
pGEX-2T	MmRhoBTB3-GTPase	1-204
pGEX-2T	HsRhoBTB3-GTPase	1-200
pGEX-4T	E2	1-147
pGEX-4T-1	Muf1	537-796
pQE30	MmRhoBTB1-GTPase	1-204
pGEX-4T-1NTEV	MmRhoBTB3	1-611
pGEX-4T-1NTEV	MmRhoBTB3-GB1	1-388
pGEX-4T-1NTEV	MmRhoBTB3-GB1B2	1-518

Darüber hinaus wurden die folgenden Konstrukte verwendet:

pGEX2TK/HsRac1	F. Rivero
----------------	-----------

2.1.10 Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien

Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> XL1-Blue	Bullock, 1987
<i>E. coli</i> BL21 (DE)	Studier, 1986
<i>E. coli</i> M15	Hanahan, 1983

Hefestämme:

Y187	Harper et al., 1993
Y190	Harper et al., 1993 ; Flick und Johnston, 1990

Zelllinien (Name, Organismus, Gewebe):

COS7, *Cercopithecus aethiops*, Niere
HeLa, *Homo sapiens*, Cervixkarzinom
HEK293, *Homo sapiens*, Niere
PAE, *Sus scrofa*, Herzendothel

2.1.11 Kultur-Medien**2.1.11.1 Kultur-Medien für Bakterien**

Die verwendeten Medien (pH 7,4) wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und bei 120°C autoklaviert. Antibiotika (100 mg/l Ampicillin oder 50 mg/l Kanamycin) wurden nach Abkühlen des Mediums hinzugegeben. Für die Herstellung von Agarplatten wurden den Medien 0,9% (w/v) Agar-Agar und bei Bedarf 100 mg/l Ampicillin oder 50 mg/l Kanamycin zugesetzt. Für die Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten wurden die fertigen Platten jeweils mit 10 µl 1 M IPTG-Lösung und 10 µl X-gal-Lösung (2% in DMF) bestrichen.

LB-Flüssig-Medium:

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

SOC-Medium:

20 g Bacto-Trypton
5 g Hefextrakt
0,5 g NaCl
20 mM Glucose
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

2.1.11.2 Kultur-Medien für HefestämmeYEPD-Medium

20 g Difco Pepton

10 g Hefeextrakt

auf 1 l mit Wasser auffüllen.

YEPD-Agarplatten:

20 g Difco Pepton

10 g Hefeextrakt

18 g Agar-Agar

auf 1 l mit Wasser auffüllen.

100x Adeninlösung:

200 mg Adenin in 100 ml Wasser mit etwas HCl lösen und steril filtrieren.

100x Tyrosinlösung:

300 mg Tyrosin in 100 ml Wasser mit etwas NaOH lösen und steril filtrieren.

100x Histidinlösung:

200 mg Histidin in 100 ml Wasser lösen und steril filtrieren.

100x Leucinlösung:

200 mg Leucin in 100 ml Wasser lösen und steril filtrieren.

100x Tryptophanlösung:

200 mg Tryptophan in 100 ml Wasser lösen und steril filtrieren.

100x Uracillösung:

200 mg Uracil in 10 ml Wasser unter Erwärmen lösen und steril filtrieren.

20%ige Glucoselösung:

200 mg Glucose mit 1 l Wasser auffüllen und steril filtrieren.

10x Aminosäurelösung:

300 mg Isoleucin

1500 mg Valin

200 mg Arginin

300 mg Lysin

200 mg Methionin

500 mg Phenylalanin

2000 mg Threonin

mit Wasser auf 1 l auffüllen und steril filtrieren.

Die Zusammensetzung der Hefe-Selektionsmedien und Hefe-Agarplatten ist in Tabelle 2.6 angegeben. Nach der Zugabe von Yeast Nitrogen Base, Agar-Agar und Wasser wurde die Mischung zunächst autoklaviert. Die Zugabe der restlichen Stocklösungen erfolgte nach Abkühlung auf 55°C.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der Hefe-Selektionsmedien.

	SD/-Leu	SD/-Trp	SD/-Leu/-Trp
Yeast Nitrogen Base [g]	6,7	6,7	6,7
Agar-Agar [g]	20	20	20
Wasser [ml]	750	750	770
20%ige Glucoselösung [ml]	100	100	100
10x Aminosäurelösung [ml]	100	100	100
100x Adenin [ml]	10	10	10
100x Tyrosin [ml]	10	10	10
100x Uracil [ml]	10	10	10
100x Histidin [ml]	10	10	10
100x Leucin [ml]	-	10	-
100x Tryptophan [ml]	10	-	-

2.1.11.3 Kultur-Medien für Säugetierzellen

Kultur-Medium für COS7- und HEK-Zellen:

DME Medium 'high glucose' (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma)

10% FBS

2 mM Glutamin

2 mM Pyruvat

2 mM Penicillin

2 mM Streptomycin

Kultur-Medium für HeLa-Zellen:

DME Medium 'high glucose' (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma)

10% FBS

2 mM Glutamin

2 mM Penicillin

2 mM Streptomycin

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* ist eine abgewandelte Form der kommerziellen Aufreinigung gemäß Machery-Nagel (2.2.2). Hierzu wurden 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl der Lösung I (15 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Danach wurden 150 µl der Lösung II (0,2 N NaOH, 1% SDS) hinzugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung wurden bei diesem Reaktionsschritt die Zellmembranen zerstört. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) wurden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 18.000 x g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 320 µl Isopropanol überführt. Die durch Isopropanolzugabe gefällte Plasmid-DNA wurde für 10 min bei 18.000 x g pelletiert. Nach einem Waschschriff mit Ethanol (70%) wurde die Plasmid-DNA getrocknet, in 20 µl 10 mM Tris-HCl aufgelöst und mit 2 µl RNase (10 mg/ml) behandelt.

2.2.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA nach Roche/Macherey-Nagel

Um bis zu 40 µg saubere Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen zu gewinnen (z.B. Proben für eine Sequenzanalyse), wurde das „High Pure Plasmid Purification“-Kit von der Firma Roche benutzt. Hierzu wurden 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, abzentrifugiert. Das Pellet wird in 250 µl der Lösung 1, die RNase enthält, resuspendiert. Danach werden 250 µl der Lösung 2 hinzugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung werden bei diesem Reaktionsschritt die Zellmembranen zerstört und die RNA durch die RNase verdaut. Nach Zugabe von 300 µl Lösung 3 wird die Reaktionsmischung 5 min auf Eis inkubiert. Dadurch werden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 18.000 x g und 4°C wird der Überstand auf eine NucleoSpin-Säule gegeben. Es wird 1 min bei 18.000 x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bindet. Anschließend wird die Säule mit 500 µl Puffer 5 und dann mit 600 µl Puffer 6 gewaschen. Danach wird noch einmal zentrifugiert, um Ethanolreste des Puffers zu entfernen. Zur Elution werden schließlich 30-50 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben, 1 min bei RT inkubiert und dann 1 min bei 18.000 x g abzentrifugiert.

Für größere Mengen sauberer Plasmid-DNA wurde das „NucleoBond AX 100-Kit“ von der Firma Macherey-Nagel benutzt. Dieses Kit arbeitet nach dem gleichen Prinzip, ermöglicht aber die Aufreinigung von bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus einer 30 ml Bakterienübernachtskultur.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.3.1 Amplifikation von DNA

Zur Synthese von DNA-Fragmenten wurde die Taq-Polymerase verwendet und die Reaktionen in einem programmierbaren „Thermocycler“ durchgeführt. Die Reaktionsparameter wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst. Eine Standardreaktion umfasst ein Volumen von 20 µl und folgende Zusammensetzung:

x µl Template-DNA (~100 ng Plasmid-DNA)
1 µl Oligonukleotid 5'-3' (10 pmol/ml)
1 µl Oligonukleotid 3'-5' (10 pmol/ml)
1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
2 µl 10x PCR-Puffer (100 mM Tris/HCl (pH 8,3); 500 mM KCl; 20 mM MgCl₂)
1 µl Taq-Polymerase (3-4 U)
mit Wasser auf 20 µl auffüllen.

2.2.3.2 Semi-quantitative PCR

Ziel der quantitativen PCR ist es, aus der Menge der an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Menge an eingesetztem DNA-Template zu schließen. Die semi-quantitative PCR wurde mit einem kommerziellen Fluoreszenz-Detektionskit (SYBR Green PCR Kit) durchgeführt. Nach initialer Denaturierung der Template-DNA bei 95°C für 15 min wurden 40 Zyklen (30 sek bei 95°C; 30 sek bei 55°C; 30 sek bei 72°C) gefahren. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und jeder Ansatz enthielt sowohl Oligonukleotide der zu quantifizierenden Zielsequenz (2.2.3.1) als auch für eine interne Normalisierung GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) Oligonukleotide. Mit Hilfe eines Agarosegels wurden die PCR-Produkte aufgetrennt und mittels einer CCD Kamera digitalisiert. Anschließend konnten die spezifischen Bandenintensitäten quantifiziert (ImageQuant Software) und mit GAPDH-Werten normalisiert werden.

2.2.3.3 Real-Time-PCR

Bei dieser Variante der quantitativen PCR lagert sich ein Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Spezifität in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein. Die während der Synthese gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Menge und damit proportional zur Menge an Ausgangs-DNA. Die quantitative PCR wurde mit einem kommerziellen Fluoreszenz-Detektionskit (QuantiTect SYBR Green PCR Kit) und einem „Real-Time-Block Thermocycler“ (MJ Research DNA Engine Opticon) durchgeführt. Die jeweiligen Ansätze bestanden aus 10 µl QuantiTect Master Mix (HotStarTaq DNA-Polymerase; PCR-Puffer; dNTP-Mix; SYBR Green, Referenzfarbstoff ROX; 5 mM MgCl₂), 300 ng Template-DNA, 10 pmol/ml Oligonukleotide und wurden mit RNase-freiem

Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt. Nach dem Real-Time-PCR-Programm (95°C für 15 min; 94°C für 30 sek; 55°C für 30 sek; 72°C für 30 sek; Zyklen 30-35) konnte mit der integrierten Software des „Thermocyclers“ nach Herstellerangaben die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden.

2.2.4 Konzentrationbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch bei 260 bzw. 280 nm mit Wasser oder TE als Referenz bestimmt. Eine OD von 1 entspricht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich folgende Beziehung:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen lässt sich mit Hilfe des Quotienten OD_{260}/OD_{280} abschätzen. Beträgt der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, kann die DNA- bzw. RNA-haltige Lösung als rein angesehen werden. Isolierte RNA wird bei -80 C, Plasmid-DNA wird bei -20°C gelagert.

2.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegel-Matrix. Je nach Verwendung und Auftrennungsziel wurden 0,7-2,0%ige Gele in TAE-Puffer oder TBE-Puffer verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose im Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,1 µg/ml) und nach Abkühlung auf einen Gelträger verschiedener Größe (7,5 cm x 8 cm, 11,5 cm x 14 cm) mit Taschenformer gegossen. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Probenaschen geladen. Die DNA-Auftrennung erfolgte in entsprechendem Puffer horizontal in Flachbett-Gelapparaturen. In Abhängigkeit von der Gelgröße, Laufdauer und Auftrennungseffizienz wurde eine Spannung von 20 V bis 140 V angelegt. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die DNA mit einem Transilluminator ($\lambda = 302$ nm) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren unter

UV-Licht mit einem Videodokumentationsgerät. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte jeweils im Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard.

5x Probenpuffer:

30% Glycerin

0,25% Bromphenolblau

in TE-Puffer

1 kb DNA Leiter (Life Technologies):

12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp.

2.2.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zunächst wurde die mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA im TAE-Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit der Firma Macherey-Nagel. Dabei wurde die Bande des gewünschten DNA-Fragments mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zu je 100 mg Agarosegel wurden jeweils 200 µl Puffer NT1 pipettiert. Die Probe wurde 10 min auf 50°C erwärmt, zwischendurch geschüttelt und anschließend auf eine NucleoSpin-Säule geladen. Diese wurde für 1 min bei 10.000 x g abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgten 2 Waschschriffe mit je 600 µl und 200 µl Puffer NT3 mit Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g. Nach erneuter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, um Pufferreste zu entfernen, wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Elution mit 30 µl Puffer NE.

2.2.7 In vitro-Rekombination von DNA

2.2.7.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem und unter den empfohlenen Temperaturbedingungen. Pro µg DNA wurden 2 bis 10 U eingesetzt und die Plasmid-DNA 2 bis 4 Std verdaut. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mit Hilfe eines Agarosegels kontrolliert.

2.2.7.2 Dephosphorylierung der 5'-Enden von linearisierten Vektoren

Zur Verhinderung der Re-Ligation eines linearisierten Vektors, der nur mit einer Restriktionsendonuklease verdaut wurde, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase entfernt. Dafür wurden in einem 20 µl Ansatz 1-2 µg linearisierte Vektor-DNA mit 1 U alkalischer Phosphatase in CIP-Puffer 10 min bei 37°C inkubiert. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde durch 10-minütige Inkubation bei 65°C gestoppt. Überschüssige Desoxynukleotide wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließender Ethanol-Präzipitation entfernt.

10x CIP-Puffer:

0,5 M Tris/HCl (pH 8,5)

10 mM MgCl₂

2.2.7.3 Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten

Für Ligationen mit kohäsiven Enden wurde das zu klonierende Fragment in dreifachem molarem Überschuss zum Vektor eingesetzt. Dafür wurden in einem 20 µl Ansatz 1-3 µg Gesamt-DNA mit 1 U T4-DNA-Ligase in Ligationspuffer in der Regel über Nacht bei ca. 8°C inkubiert.

10 x Ligationspuffer:

660 mM Tris/HCl (pH 7,5)

50 mM MgCl₂

50 mM DTT

10 mM ATP

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch das Service-Labor des ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) auf einem ABI Prism 377 Sequencer der Firma Applied Biosystems. Neben speziellen Sequenzierprimern für die jeweiligen Vektoren wurden sequenzspezifische Oligonukleotide verwendet.

2.2.9 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.2.9.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Eine Übernachtskultur von XL1-Blue-Zellen wird in 250 ml LB-Medium bei RT bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,5 angezogen. Die Kultur wird für 20 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 2.500 x g und 4°C pelletiert. Das Zellpellet wird in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer in einem Eisbad resuspendiert, um danach wieder abzentrifugiert zu werden. Daraufhin wird das Pellet in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und mit 1,6 ml DMSO versetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min im Eisbad werden Aliquots von 100 µl in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Transformationspuffer:

10 mM PIPES

15 mM $CaCl_2$

250 mM KCl

Nach pH-Einstellung auf 6,7 mit KOH und der Zugabe von $MnCl_2$ (55 mM Endkonzentration) wird die Lösung steril filtriert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

2.2.9.2 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Ein 100 µl Aliquot der chemokompetenten *E. coli*-Zellen wird auf Eis angetaut und mit 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen für 45 sek auf 42°C erhitzt und sofort danach wieder für 2 min auf Eis gekühlt. Danach werden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 1 Std bei 37°C inkubiert. 50 µl Aliquot werden sofort, der restliche Ansatz nach Pelletierung, auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert.

2.2.10 *E. coli*-Dauerkulturen

Wichtige Transformanten werden als Dauerkultur konserviert. Dazu wurden 850 µl der Übernachtskultur mit 150 ml Glycerin gut gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.11 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

Als Sonde dienten PCR-Produkte (~600-bp), die mittels PCR aus einem vollständigen Konstrukt und spezifischen Oligonukleotiden gewonnen wurden. Die DNA-PCR-Produkte wurden mit einem High Pure PCR Purification Kit (Roche) aufgereinigt und photometrisch die DNA-Konzentration (2.2.4) bestimmt. Die radioaktive Markierung erfolgte mit 50 ng des gereinigten PCR-Produkts und 50 mCi Adenosin 5'-[α - 32 P]-triphosphat (10 mCi/ml; Amersham Pharmacia Biotech) mit dem Random Primed DNA Labeling Kit gemäß den Anleitungen des Vertreibers. Nicht eingebaute Nukleotide wurden danach durch Zentrifugation (3.000 UpM, 2 min) über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt.

Sephadex G-50-Säule:

30 g Sephadex G-50 werden in 250 ml TE-Puffer (pH 8,0) gegeben. Zur Präparation einer Chromatographiesäule wird Sephadex G-50 in eine 1 ml Einwegspritze, deren Auslassöffnung mit einem Pfropfen silanisierter Glaswolle verschlossen wurde, gegeben. Durch 2-minütige Zentrifugation bei 1.000 UpM wird der Puffer abgetrennt und die Säule fest gepackt. Insgesamt verwendet man so viel Sephadex G-50, bis das Volumen der gepackten Säule 0,9 ml beträgt. Die Säule wird sofort verwendet.

2.2.12 Untersuchung der Genexpression

Zur Untersuchung der Expressionsmuster von humanem Tumorgewebe im direkten Vergleich mit gesundem Gewebe wurde ein *cancer profiling array* der Firma Clontech verwendet. Die Einflüsse verschiedener chemotherapeutischer Agenzien, Streß-Induktoren und schädliche Strahlungen auf humane Tumorzelllinien wurden mit einem *cancer cell line profiling array* ermittelt. Zur Herstellung dieser Blots wurde aus RNA mittels Clontech's Premium RNATM SMARTTM cDNA synthetisiert und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und immobilisiert. Informationen sind auf der Internetseite der Firma Clontech erhältlich (<http://bioinfo.clontech>).

cancer profiling array (CPA):

Kat.Nr. 7841-1

Lot.Nr. 1100893

cancer cell line profiling array (CCLPA):

Kat.Nr. 7848-1

Lot.Nr. 2090917

Der Nachweis erfolgte mit Hilfe von radioaktiv markierten DNA-Sonden (2.2.11). Die Hybridisierung der Sonde mit der immobilisierten cDNA erfolgte wie unter 2.2.13 beschrieben.

2.2.13 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden

Zur Vorhybridisierung wurden der CPA und CCLPA (2.2.12) 30 min bei 68°C in BD ExpressHyb™ Lösung (Clontech) mit 1,5 mg Lachssperma-DNA inkubiert. Anschließend wurden sie 12-14 Std mit 50 ng ³²P-markierter DNA, 30 µg C₀t-1, 150 µg Lachssperma-DNA und 50 µl 20x SSC nach 5-minütigem Aufkochen bei 68° hybridisiert. Unspezifisch gebundene DNA wurde in folgenden Waschschrritten entfernt: 4 x 30 min bei 68°C in je 200 ml Waschlösung I, 4 x 30 min bei 68°C in je 200 ml Waschlösung II.

Waschlösung I:

0,2x SSC

1% SDS

Waschlösung II:

0,2% SSC

0,5%SDS

Die Signale der Membranen wurden 2 Tage unter Verwendung eines Phosphorschirm und verschiedenen Zeitintervallen unter Verwendung von Autoradiographiefilmen (ECL Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech) autoradiographisch nachgewiesen. Zur mehrmaligen Verwendung konnte die radioaktive Markierung durch Aufkochen in 0,1x SSC/1 mM EDTA/0,5% SDS entfernt werden. Zur Überprüfung der Integrität der Proben auf der Membran und zum Normalisieren wurde radioaktiv markiertes Ubiquitin verwendet. Die Auswertung wurde mit einem Phosphorimager 445si und ImageQuant Software erledigt. Nach Hintergrundabgleich wurden die spezifischen Signale mit der Intensität des entsprechenden Ubiquitin-Signals abgeglichen.

2.2.14 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen gemäß Qiagen

Zum Schutz vor RNasen wurden während der Arbeit stets Handschuhe getragen. Außerdem wurden nur sterile Plastikgefäße und Pipetten sowie autoklavierte

Lösungen verwendet. Um bis zu 35 µg saubere Gesamt-RNA aus Säugetierzellen zu gewinnen, wird das von der Firma Qiagen angebotene „RNeasy“-Kit benutzt. Für eine RT-PCR wurden die Zellen einer 80-90% konfluenten Gewebekulturflasche mit 350 µl RLN (4°C) geerntet. Der Zell-Überstand nach Zentrifugation bei 300 g für 2 min wurde mit 600 µl RLT-Puffer, der Zellen aufschließt und gleichzeitig RNasen inhibiert, versetzt. Nach Zugabe von 430 µl 70%igem Ethanol wurde die Lösung auf die RNeasy-Säulen gegeben und bei 8.000 x g für 15 sek zentrifugiert. Nach mehrmaligen Waschschritten (700 µl RW1-Puffer und 2 x 500 µl RPE-Puffer) wurde die Säule durch 2-minütige Zentrifugation bei 8.000 x g getrocknet. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte mit 50 µl RNase-freiem Wasser bei 8.000 x g für 1 min. Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.15 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das RNA in DNA umschreiben kann. In dieser Arbeit wurde für die RT-Reaktion Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Umschreibung in cDNA wurden randomisierte Hexanukleotide p(dN)₆ gewählt, die während der Reaktion an beliebigen Stellen der RNA binden und so die Synthese vieler cDNA-Stränge ermöglichen. Für die RT-Reaktion wurden 1-5 µg RNA eingesetzt und nach dem folgenden Protokoll in cDNA umgeschrieben:

3 µg RNA

2 µl p(dN)₆ Hexanukleotide

mit Wasser auf 15 µl auffüllen 5 min bei 70°C inkubieren,

5 µl 5x Reaktions-Puffer

1,25 µl dNTP-Mix (10 mM)

1 µl RNAsin (40 U/µl)

1 µl M-MLV-Transkriptase (RNase H⁻)

1 Std Inkubation bei 37°C.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Proteinexpression

Für die Expression rekombinanter Proteine unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren Tac- oder T5-Promotors wurden die *E. coli*-Stämme XL1-Blue, M15 und BL21 verwendet. Übernachtskulturen der entsprechenden Transformanten wurden 1:100 in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt, und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bzw. 0,7 unter Schütteln (250 UpM) inkubiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonz.) induziert, die Zellen wurden anschließend weitere 4 Std bzw. ü.N. bei 37°C geschüttelt und nach der Ernte durch Zentrifugation (6.000 x g; 10 min) in Lysis-Puffer resuspendiert. Bei Verwendung des Vektors pGEX-4T bzw. pQE ist das exprimierte Protein mit Glutathion-S-Transferase bzw. 6xHis fusioniert, um die Reinigung mit Glutathion-Sepharose bzw. Nickel-Sepharose zu ermöglichen.

2.3.2 Aufreinigung von Proteinen

2.3.2.1 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Das Zellpellet einer 50 ml Bakterienkultur wurde in 5 ml Puffer Lysis-Puffer resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat für 1 min mit Ultraschall behandelt und 15 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Triton X-100 (1% Endkonzentration) versetzt. Danach wurde der Überstand zu 100 µl mit PBS äquilibrierter Glutathion-Agarose-Matrix gegeben und 1 Std bei 4°C geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1.000 x g wurde mehrmals mit Waschpuffer gewaschen. Um GST-Fusionsproteine von der Glutathion-Agarose-Matrix zu trennen, erfolgte eine Elution mit 500 µl Elutionspuffer. Die gereinigten Fusionsproteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.3.7) analysiert.

Lysis-Puffer:

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

300 mM NaCl

10 mM MgCl₂

4 mM DTT

Waschpuffer:

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

1 M NaCl

10 mM MgCl₂

Elutionspuffer:

1 M Tris (pH 8,0)

10 mM NaCl

20 mM reduziertes Glutathion

2.3.2.2 Aufreinigung rekombinanter His-Fusionsproteine (pQE-System)

Das Zellpellet einer 50 ml Bakterienkultur wurde in 5 ml Puffer Lysis-Puffer resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat für 1 min mit Ultraschall behandelt und 30 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Triton X-100 (1% Endkonzentration) versetzt. Danach wurde der Überstand zu 1 ml in Lysis-Puffer äquilibrierten Nickel-NTA-Sepharose gegeben und 2 Std bei 4°C geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1.000 x g wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde viermal mit 500 µl Elutionspuffer eluiert, wobei nach jeder Pufferzugabe 5 min inkubiert wurde. Die gereinigten Fusionsproteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.3.5) analysiert.

Lysis-Puffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

Waschpuffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

Elutionspuffer:50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Lowry-Methode durch Kupferkomplexbildung: 50 µl Probe bzw. Wasser wurden 10 min bei RT mit 1 ml Lösung I versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Lösung II und eine weitere Inkubation von 30 min bei RT. Die Absorption der gebildeten Protein-Kupferkomplexe wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 660 nm gegen ebenfalls versetztes Wasser als Leerwert bestimmt. Anhand einer mit BSA aufgestellten Eichgeraden (1-20 µg) konnte aus den so erhaltenen Werten die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Lösung I:0,8 ml 2% CuSO₄ x H₂O

0,8 ml 4% K-Na-Tartrat

38,4 ml 3% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOHLösung II:

1 Volumen Folinreagenz

2 Volumen Wasser

2.3.4 Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern

Polyklonale Antikörper wurden aus Seren immunisierter Kaninchen durch Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinigung beruht auf einer spezifischen und reversiblen Bindung der Antikörper an einen Liganden, der kovalent an die Säulenmatrix gebunden ist.

2.3.4.1 Liganden-Kopplung an die Säulenmatrix

Das Ligandenprotein (hier: RhoBTB3-GTPase) wurde in großen Mengen exprimiert (2.3.1) und mit 6 M Harnstoff solubilisiert. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe präparativer SDS-PAGE, wobei keine Gelkämme verwendet wurden (Tab. 2.7). Anschließend wurden die Proteingele 5 min in einer 0,3 M Kupferchlorid-Lösung

angefärbt, kurz in Wasser geschüttelt und auf einem dunklen Untergrund die breite Proteinbande ausgeschnitten. Die Elektroelution wurde mit dem Proteinelutionsystem und speziellen Membran-Kappen der Firma Biorad bei konstanten 40 mA für 4 Std durchgeführt. Nach Vereinigung der Fraktionen wurden die Proteine 2-3 Tage dialysiert (0,1 M NaHCO₃; 30% DMF; 0,5 M NaCl, pH 8,3). Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proteinlösung mit 200 mg aktivierter (1 ml 1 mM HCl bei RT für 15 min) Cyanbromid-Sepharose bei 4°C ü.N. im Schüttler. Nach mehrmaligem Waschen mit Dialysepuffer und Zentrifugation (700 UpM) wurde die entstandene Säulenmatrix mit 1 M Glycin 2 Std bei RT blockiert. Nach erneutem Wechsel mit 1x PBS und 0,2 M Glycin (pH 2,8) wurde die Säule schließlich beladen und bei 4° C gelagert.

Tabelle 2.7: Lösungen zur Herstellung von präparativen Gelen für SDS-PAGE.

	15% Trenngel	4% Sammelgel
Acrylamid (30 %) [ml]	15	0,67
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) [ml]	7,5	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) [ml]	-	1,25
10 %ige SDS-Lösung [µl]	300	50
deionisiertes H ₂ O [ml]	7,1	3
TEMED [µl]	10	2,5
10 % APS [µl]	150	25

Kupferchlorid-Lösung:

8 g Kupferchlorid in 200 ml Wasser

2.3.4.2 Affinitätschromatographie

2 ml Antiserum wurden zunächst 1 Std bei 4°C und 14.000 UpM zentrifugiert und danach 2 ml Serum mit 2 ml PBS versetzt. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe zirkulierte die Antikörperlösung ü.N. immer wieder über die Säule. Am nächsten Tag wurden mit PBS IgG-Kontaminanten und die Antikörper entfernt, die nicht gegen das Antigen gerichtet waren. Die Elution der spezifischen Antikörper erfolgte mit 0,2 M Glycin. Die aufgefangenen Antikörper wurden mit 300 µl 0,5 M Na₂CO₃ neutralisiert. Die Proteinkonzentration der Antikörperlösung wurde nach Lowry (2.3.3) bestimmt. Die Antikörper wurden bei -20°C gelagert.

2.3.5 Immunpräzipitation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich überexprimierte Proteine immunpräzipitiert. Dazu wurden die zu präzipitierenden Proteine in COS7-Zellen transfiziert (2.4.3.2) und 40 Std später aufgearbeitet.

2.3.5.1 Immunpräzipitation mit „Myc-Tag Protein Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec)

Die analytische Immunpräzipitation mittels „Myc-Tag Protein Isolation Kit“ der Firma Miltenyi wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden Zellen in 10 cm Schalen mit 1 ml eiskaltem Lysispuffer versetzt und mit einem Zellschaber abgekratzt. Nach Überführung in ein Reaktionsgefäß wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 10.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 50 µl anti-myc MicroBeads weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach Platzierung und Aktivierung der µMACS Säulen in dem µMACS Separator wurden diese mit dem Lysat beladen. Ungebundenes Material wurde mit stringenten Waschschritten (4 x 200 µl Waschpuffer 1; 1 x 200 µl Waschpuffer 2) entfernt. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch 5-minütige Inkubation mit 20 µl 95°C heißem Elutionspuffer, während die anti-myc MicroBeads in der Säule zurück blieben. Nach erneuter Zugabe von 50 µl Elutionspuffer wurde das Präzipitat aufgefangen und konnte anschließend in der SDS-PAGE analysiert werden.

2.3.5.2 Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose CL4B (Pharmacia)

Die Zellen wurden gewaschen, mit 1 ml RIPA-Puffer lysiert und 20 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde nach Zugabe von 20 µl Protein A-Sepharose CL4B (Pharmacia) 1 Std bei 4°C im Rotationsschüttler inkubiert und die unspezifisch bindenden Proteine durch 5-minütige Zentrifugation bei 2.000 x g entfernt. Der Überstand wird 2 Std mit 1 µg Antikörper bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden 20 µl Protein A-Sepharose zugefügt und nochmal 1 Std bei 4°C rotiert. IgG Antikörper binden an Protein A-Sepharose. Anschließend wurde die Suspension abzentrifugiert und das Präzipitat viermal mit PBS gewaschen, bevor es mit 40 µl SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei RT inkubiert bzw. aufgekocht und in der SDS-PAGE aufgetrennt wurde.

RIPA-Puffer:

150 mM NaCl

50 mM Tris/HCl, pH 8,0

0,1% SDS

1% NP-40

0,5% Na-deoxycholate

0,1 mM PMSF

Protease Inhibitor Cocktail.

2.3.6 GST-Kopräzipitation

Um Proteininteraktionen *in vitro* nachweisen zu können, wurden GST-Kopräzipitationen (GST-pull down) durchgeführt. In *E. coli* wurde eines der zu untersuchenden Proteine als GST-Fusionsprotein oder nur GST als Kontrolle exprimiert und mit Glutathion-Sepharose (GSH) mit Hilfe von Zentrifugensäulchen der Firma Pierce gereinigt (2.3.1 und 2.3.2.1). 50 µl beladene GSH wurden mit 700 µl Zellysat (vgl. 2.3.5.1) des möglichen Bindungspartners 1 Std bei 4°C inkubiert, bei 1.000 x g abzentrifugiert und sechsmal 30 min bei 4°C mit Lysis-Puffer der Säugerzellen gewaschen. Mit 50 µl SDS-Probenpuffer wurden die Proben eluiert, aufgeköcht und anschließend in der SDS-PAGE analysiert.

2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenauffrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE mit dem System der Firma Biorad wurde unter denaturierenden Bedingungen in 10-18%igen Trenngelen (Tab. 2.8) durchgeführt. Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Bedarf mit unterschiedlichen Mengen 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. In der Regel wurden 10-20 µl Proteinlösung in jede Probentasche geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung zwischen 80 und 140 V in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer. Als Größenstandard wurde ein Gemisch definierter Proteingrößen verwendet.

Molekülmassenstandard:

LMW-Marker (Pharmacia): 94; 67; 43; 30; 20,1; 14,4 kDa

5x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,5)
 4,0 ml 10 % Natriumdodecylsulfat
 2,0 ml Glycerin
 1,0 ml β -Mercaptoethanol
 200 μ l 10 % Bromphenolblau

10x SDS-PAGE-Laufpuffer:

0,25 M Tris
 1,9 M Glycin
 1% Natriumdodecylsulfat

Tabelle 2.8: Lösungen zur Herstellung von Minigelen für SDS-PAGE.

	<u>Trenngele</u>				<u>Sammelgel</u>
	10%	12%	15%	18%	5%
Acrylamid (30 %) [ml]	19,7	23,6	30	36	4,1
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) [ml]	16	16	16	16	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) [ml]	-	-	-	-	2,4
10%ige SDS-Lösung [μ l]	590	590	590	590	240
deionisiertes H ₂ O [ml]	23,5	19,6	13,2	7,2	17,2
TEMED [μ l]	23	23	23	23	20
10% APS [μ l]	240	240	240	240	360

2.3.8 Färbung von Polyacrylamidgelen

Zur Färbung der aufgetrennten Proteine wurden SDS-Gele 20 min in Färbelösung bei RT geschüttelt. Der nicht an Proteine gebundene Farbstoff wurde durch Schütteln in Entfärberlösung entfernt.

Färbelösung:

0,1% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R 250
 50% (v/v) Methanol
 10% (v/v) Essigsäure
 Danach wird die Färbelösung filtriert.

Entfärbelösung:

10% (v/v) Ethanol

7% (v/v) Essigsäure

2.3.9 Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)

Proteine wurden mit dem Semi-Dry-Transfer-Verfahren (Halbtrocken-Transfer) in einer Kammer der Firma Biorad auf Membranen übertragen. Dazu wird das Gel auf eine mit Wasser befeuchtete Nitrocellulosemembran überführt und auf drei mit Towbin-Puffer getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Der Stapel mit dem Gel wird luftblasenfrei auf die Anode der Blotkammer gelegt. Der Stapel wird mit drei weiteren in Towbin-Puffer getränkte 3 MM Whatman-Filterpapier überschichtet. Dann wird die Kammer mit der Kathode verschlossen und der Transfer über 20-60 min je nach Gelgröße bei 10 V bis 15 V durchgeführt.

Towbin-Puffer:

39 mM Glycin

48 mM Tris/HCl, pH 8,3

20% Methanol

2.3.10 Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Nach erfolgtem Western-Blot wurden die Proteine reversibel mit Ponceau-S-Farbstoff gefärbt. Dies sollte einerseits die Kontrolle über die Effizienz des Blottens gewährleisten, andererseits auch die Möglichkeit bieten, die Banden des Molekülgrößenmarker zu kennzeichnen. Die Membran wurde dazu für 1-2 min in Ponceau-Färbelösung (1:20 in Wasser verdünnt) gelegt und geschüttelt. Anschließend wurde sie kurz unter fließendem Wasser abgespült. Sobald Proteinbanden sichtbar wurden, wurden die Banden des Molekülgrößenmarkers mit Kugelschreiber dauerhaft markiert. Die vollständige Entfärbung der Membran erfolgt durch NCP-Puffer.

2.3.11 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Proteintransfer für mindestens 1 Std mit 5% Milchpulver/NCP-Puffer abgesättigt, bevor sie mit Hybridomaüberständen (1:5 verdünnt mit NCP-Puffer) oder aufgereinigten Antikörpern (verdünnt nach Herstellerangaben mit NCP-Puffer) für mindestens 1 Std bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran für 3 x 10 min mit NCP-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran für 1 Std mit einem sekundären Antikörper, der an Peroxidase gekoppelt war. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch 3 x 10 min Waschen mit NCP-Puffer entfernt. Die Immunmarkierung wurde mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Dabei oxidiert die am sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase Luminol, was zu einer Lichtemission bei 430 nm führt. Dies verursacht eine Schwärzung des Röntgenfilms. Die Membran wurde kurz in der Chemilumineszenz-Lösung inkubiert und ein Röntgenfilm für 5 sek bis ü.N. exponiert.

Chemilumineszenz-Lösung:

2 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0)

200 µl Luminol (3-Aminonaphthylhydrazid; 0,25 M in DMSO)

89 µl p-Cumarsäure (0,1 M in DMSO)

18 ml Wasser

5,6 µl H₂O₂-Lösung (30%)

2.3.12 Entfernung der Antikörper nach Immundetektion

Durch diese Methode werden primäre und sekundäre Antikörper von einer zuvor zur Immundetektion verwendeten Westernblotmembran entfernt. Dafür wurde die Membran 2 x 5 min bei RT in 0,5 M NaOH geschüttelt und anschließend mehrmals mit NCP-Puffer ausgiebig gewaschen. Die Membran steht nun für eine erneute Immunmarkierung und Detektion von Proteinen (2.3.11) zur Verfügung. Alternativ wurde das „Western-Blot Recycling Kit“ der Firma Chemicon nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultur von Säugerzellen

Säugerzellen wurden in Zellkulturschalen im Brutschrank in DME-Medium bei Wasser gesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ bei 37°C mit modifiziertem DME-Medium kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 3 ml/100 mm Schale 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst (ca. 3 min bei 37°C). Die Zellen wurden 1:10 in DME-Medium/FBS verdünnt und ausplattiert.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

10⁷ Zellen wurden in 5 ml Einfriermedium aufgenommen. Das schrittweise Einfrieren von Zellen in 1 ml Kryo-Röhrchen erfolgte bei -80°C für 24 Std in speziellen Isopropanol-gefüllten Einfrierschalen. Danach wurden die Säugerzellen in flüssigen Stickstoff überführt. Aufgetaut wurden die Zellen zügig bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort in DME-Medium gegeben.

Einfriermedium:

70% DMEM

20% FCS

10% DMSO

2.4.3 Transfektion von Säugetierzellen

Für transiente Transfektionen wurden die Säugetierzellen in entsprechenden Kulturschalen ausgesät und bei einer erreichten Konfluenz von 70-80% transfiziert.

2.4.3.1 Transfektion von DNA in Säugetierzellen mittels Lipofectamin

Die biologische Transfektion (Felgner et al., 1987) mit dem liposomalen Transfektionsreagenz wurde für Zellen verwendet, mit denen später Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden sollte. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer 6-Loch Platte mit Deckgläschen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und die Transfektionsansätze nach

Herstellerangaben vorbereitet. Dazu wurden 1 µg der zu transfizierenden DNA und parallel 4 µl LipofectamineTM 2000 und 6 µl PlusTM Reagenz jeweils mit 100 µl Transfektionsmedium (ohne Antibiotika) gelöst und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden beide Lösungen vorsichtig durch Pipettieren gemischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Während sich die kationischen Komplexe formten erhielten die Zellen jeweils 800 µl des Transfektionmediums. Die gesamten 200 µl Transfektionsansätze wurden anschließend in ein Loch der 6-Loch Platte gegeben und für 2½ bis 3 Std inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und durch 3 ml DME Medium ersetzt. Die Zellen wurden 1 bis 2 Tage später aufgearbeitet.

2.4.3.2 Transfektion von DNA in Säugetierzellen mittels DEAE-Dextran

Die chemische Transfektion mit DEAE-Dextran (Schrimpf, 2000) wurde für Zellen verwendet, mit denen später biochemische Versuche durchgeführt werden sollten und somit eine höhere Anzahl an Zellen erforderlich war. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer 10 cm Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurden 7 µg der zu transfizierenden DNA in 2 ml PBS gelöst und mit 500 µg/ml DEAE-Dextran versetzt. Nach einem Waschschrift der Zellen mit PBS wurde die DEAE/PBS/DNA-Lösung zugegeben und für eine 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNA entfernt und die Zellen mit DME-Medium und 100 µM Chloroquin für weitere 3 Std inkubiert, um den rapiden Abfalls des lysosomalen pH-Werts zu verhindern. Danach wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und durch 10 ml DME Medium ersetzt. Die Zellen wurden 40 Std später verwendet.

2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

2.4.3.1 Fixieren und Permeabilisieren von Säugetierzellen

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 500 µl 3% Paraformaldehyd in PBS für 5 min bei 37°C fixiert und mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und konnten für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden.

2.4.3.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe dieser Methode lässt sich die intrazelluläre Verteilung bestimmter Proteine in fixierten Zellen (2.4.3.1) nachweisen. Dabei wurden spezifische Proteine mit ihren korrespondierenden Antikörpern markiert. Der Nachweis erfolgte dann indirekt, indem der erste Antikörper mit einem fluoreszierenden zweiten Antikörper markiert wurde, der bei Anregung mit bestimmten Wellenlängen eine sichtbare Fluoreszenz verursacht. Fixierte und permeabilisierte Zellen wurden zunächst mit 5% FBS/PBS abgesättigt und danach mit primärem Antikörper (verdünnt in 5%FBS/PBS) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit sekundärem Antikörper (verdünnt in 5% FBS/PBS) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in Gelvatol eingebettet.

Gelvatol:

20 g Gelvatol (Polyvinylalkohol) in 80 ml PBS,
40 ml Glycerin zugeben, 16 Std rühren,
15 min bei 12.000 x g zentrifugieren,
25 ng/ml DABCO zum Überstand geben,
aliquotiert bei -20°C lagern.

2.4.3.3 Konfokale Lasermikroskopie

Für die normale Fluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzlichtmikroskop DMR der Firma Leica benutzt. Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das von der Firma Leica entwickelte CLSM-SP Mikroskop benutzt, das optische Schnittebenen durch die Präparate erlaubt. Das Gerät ist mit einem HeNe- und einem Argonlaser ausgestattet und ermöglicht elektronische Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen (488 nm, 568 nm und 647 nm). Die Daten werden mit dem begleitenden Bildverarbeitungssystem der Firma Leica weiterverarbeitet.

2.4.4 Immunhistochemische Färbung

Paraformaldehyd fixierte Zellen (vgl. 2.4.3.1) wurden zunächst 20 min mit 0,3% H₂O₂ in PBS inkubiert, um die zelleigene Peroxidase zu blockieren. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen erst 10 min mit 0,5 M Ammoniumchlorid/0,25%

Triton-X 100 behandelt, bevor sie 1 Std mit 5% FBS/PBS abgesättigt wurden. Die Inkubation mit primärem Antikörper (verdünnt in 1%FBS/PBS) für 120 min erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 4 x 10 min Waschschrinen mit PBS wurden die Zellen mit Biotin-konjugierten Antikörper (1:400 in 1% FBS/PBS) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut 4 x 10 min mit PBS gewaschen. Die dritte Inkubation wurde mit Streptavidin-Biotin-Peroxidase Komplex 60 min bei RT durchgeführt. Der Nachweis der Peroxidase wurde mit Detektionslösung 10 bis 30 min unter dem Mikroskop verfolgt. Die Reaktion wurde mit PBS gestoppt und nach aufsteigender Alkoholreihe in Eukitt eingebettet.

Detektionslösung:

7,5 mg Diaminobenzidin (DAB)

6 mg NH₄Cl

300 µl 0,05 M NiSO₄ x 6 H₂O

300 µl 10% D-Glucose

50 µl Glucose Oxidase

2.5 „Yeast Two Hybrid“-System

Das Hefe Hybrid-System erlaubt die Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* und beruht auf der Rekonstitution des *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktors GAL4. Die GAL4-DNA-bindende Domäne erkennt die GAL4 stromaufwärts liegende Aktivierungssequenz auf der DNA, während die GAL4-aktivierende Domäne die Transkription von den Reportergenen lacZ und HIS3 aktiviert. Im Hefe Hybrid-System werden Fusionsproteine mit jeweils einer der GAL4-Domänen und einem potentiellen Bindungspartner hergestellt. Die getrennt exprimierten GAL4-Domänen können die Transkription nicht aktivieren. Erst bei Interaktion der Bindungspartner kommen die GAL4-bindende und GAL4-aktivierende Domäne zusammen und die Aktivierung der Transkription der Reportergene erfolgt. Die lacZ-Expression wird mit der enzymatischen Aktivität der β-Galaktosidase gemessen.

2.5.1 Modifizierte Lithiumacetat-Hefetransformationsmethode

Y187- und Y190-Hefezellen werden über Nacht in YEPD Medium bei einer Temperatur von 30°C bis zur Sättigung kultiviert. Der Überstand wird abgegossen.

Das Pellet wird in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Daran schließt sich die Zugabe von 2 ml einer 10 mg/ml Heringssperma-DNA enthaltenden Lösung und jeweils 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA an. Die Reaktionsmischung wird geschüttelt und dann mit 500 µl Plate-Mischung versetzt. Nach erneutem Schütteln werden 50 µl einer 1 M DTT-Lösung hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird nach vorherigem Schütteln über Nacht bei RT gelagert. Dann erfolgt eine Inkubation der Zellen bei 42°C für 10 min. Nach kurzer Zentrifugation wird der Überstand abgegossen und die Zellen in 200 µl Wasser resuspendiert. Die Hefesuspension wird auf die entsprechenden SD-Agarplatten ausgebracht (Tab. 2.9). Die Platten werden 5-8 Tage bei 30°C inkubiert.

Tabelle 2.9: Verwendete SD-Agarplatten für Hefetransformationen

Plasmid	SD-Agarplatte
pAS oder pGBKT7	SD/-Trp
pACT oder pGADT7	SD/-Leu
pAS und pACT/pGBKT7 und pGADT7	SD/-Leu-Trp

Plate-Mischung:

90 ml 50%ige PEG-4000-Lösung

10 ml 1 M Lithiumacetatlösung

1 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5

0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

2.5.2 Hefepaarung (Mating)

Für die Vorbereitung der Hefepaarung ist es wichtig, die Hefen unterschiedlichen Paarungstyps Y187 und Y190 auf kleinstem Raum anzunähern, damit die Paarung effizient erfolgen kann. Das Volumen der vereinigten Hefesuspension betrug 300 µl YEPD-Medium. Es wurde jeweils eine Pipettenspitze der transformierten Hefestämme Y187 und Y190, die die entsprechenden Hefe-Plasmide tragen, von den Kulturplatten abgekratzt und in YEPD-Medium gelöst. Anschließend schüttelten die Hefen ü.N. bei 30°C und wurden am nächsten Tag auf SD-Platten (-Trp/-Leu) ausplattiert. Die Platten werden 3-5 Tage bei 30°C selektioniert.

2.5.3 Filterassay der Galaktosidaseaktivität

Auf einer Agarplatte mit Hefekolonien wird ein Nitrocellulosefilter gelegt und vorsichtig so angedrückt, dass die Hefeklone daran haften bleiben. Nach kurzer Inkubation wird der Filter vorsichtig entfernt und 10 sek in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend wird der Filter bei RT aufgetaut und mit der Kolonieseite nach oben auf einen mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung angefeuchteten 3 MM Filterpapier gelegt. Die Filter werden bei 30°C inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf blau gefärbte Hefekolonien kontrolliert. Eine Autoaktivierung der Hefekonstrukte konnte durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen werden; Ausnahmen werden im Text erwähnt.

Z-Puffer, pH 7,0:

10,69 g Na₂HPO₂ x 7 H₂O

5,5 g NaH₂PO₄ x H₂O

0,75 g KCl

0,246 g MgSO₄ x 7 H₂O

mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Z-Puffer/X-Gal-Lösung:

100 ml Z-Puffer

0,27 ml 14,4 M β-Mercaptoethanol

1,67 ml X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF)

2.6 *In situ*-Hybridisierung

Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung (ISH) lassen sich Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in der Zelle am histologischen Schnittpräparat (*in situ*) nachweisen. Bei der ISH werden einsträngige Nukleinsäuren, die z.B. mit einer Digoxigenin-Markierung versehen wurden, als so genannte Sonden eingesetzt.

2.6.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Gewebegewinnung wurden Mäuse (2 Monate alt) mit 4% Paraformaldehyd-Lösung perfundiert und die entnommenen Gewebe in 70% Ethanol überführt. Die folgenden Schritte wurden in einem Einbettautomaten Citadell 1000 (Shandon) durchgeführt, wobei die Länge der Inkubationszeiten mit den Gewebetypen und deren Durchmesser variierte. Dehydrierung erfolgte in aufsteigender Ethanol-Reihe (70%, 80%, 90%, 96%, 3 x 100 % EtOH), danach 3 x Inkubation in Xylol und anschließender Infiltration mit Paraffin Nr. 3 und Paraffin Nr. 6. Die endgültige orientierte Einbettung erfolgte in Paraffin Nr. 6 und anschließender Lagerung bei RT.

Die 6 µm dicken Schnitte wurden mit einem Mikrotom (Microtom GmbH) angefertigt, in einem Wasserbad gestreckt, bei 37°C getrocknet und schließlich bei 4° C gelagert.

2.6.2 *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung von Paraffinschnitten wurde mit nachfolgendem Protokoll durchgeführt. Bei Markierungen von Säugetierzellen wurde nach Fixierung mit Paraformaldehyd (vgl. 2.4.3.1) direkt mit der Proteinase-K-Behandlung begonnen.

2.6.2.1 Entparaffinierung

Die Entparaffinierung der Paraffinschnitte erfolgte in 2 x 5 min Xylol, 3 x 2 min 100% Ethanol, 2 min 96% Ethanol, 5 min 70% Ethanol, 2 x 5 min PBS/MgCl₂. Danach folgte eine Proteinase K-Behandlung (50 µl 10 mg/ml Proteinase K) für 10 min bei 37°C. Die Behandlung wurde mit PBS/MgCl₂ gestoppt und die Schnitte für 10 min bei RT in Glycin/Tris äquilibriert.

2.6.2.2 Hybridisierung

Die äquilibrierten Schnitte wurden mit Pap-Pen (Dako) umrandet und für 1 Std bei 50°C in Prähybridisierungslösung überführt. Anschließend erfolgte die Hybridisierung ü.N. bei 50°C mit der denaturierten, markierten Probe (50 µl Formamid, 45 µl Hybridisierungslösung, 5 µl Oligonukleotid-Digoxigenin). Am nächsten Tag wurden die Schnitte 2 x 10 min und 1 x 30 min in Waschpuffer bei 50°C gewaschen.

2.6.2.3 Detektion

Der Nachweis der Digoxigenin-Sonde im Gewebe erfolgte bei RT und begann mit einer 30-minütigen Blockierungsreaktion in Puffer II. Anschließend wurden die Paraffinschnitte mit einem mit Alkalischer Phosphatase gekoppeltem anti-Digoxigenin Antikörper 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschschrift in Puffer I wurde die Farbreaktion mit der Detektionslösung im Dunkeln für 5-60 min durchgeführt, die Blaufärbung gelegentlich überprüft und mit Puffer III gestoppt. Die Eindeckelung erfolgte mit verflüssigter Glyceringelatine. Die Aufnahmen wurden mit einem Lichtmikroskop Leica DMR und einer Kamera SensiCam 12BIT COOLED IMAGING mit SensiControl 4.03 Software festgehalten.

PBS/MgCl₂:

0,5 ml 1 M MgCl₂

99,5 ml PBS

Proteinase K-Behandlung:

500 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5

500 ml 0,2 M EDTA

20 ml 5 M NaCl

Glycin/Tris:

200 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5

7,5 g Glycin

mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Prähybridisierungslösung:

5 ml 20x SSC

50 µl 10 mg/ml Lachssperma-DNA

25 ml Formamid

19,9 ml Wasser

Hybridisierungslösung:

4000 mg PEG 4000

4800 µl 5 M NaCl

400 µl 1 M MgCl₂

400 µl PIPES

400 µl 1 M DTT

200 µl 0,2 M EDTA

400 µl 10 mg/ml Lachssperma-DNA

400 µl 100x Denhardt's

200 µl 5 mg/ml tRNA

1800 µl Wasser

filtrieren und bei -20°C aufbewahren.

Waschpuffer:

200 ml 20x SSC

500 ml Formamid

300 ml Wasser

Detektionslösung:

3375 µl Puffer III

10 µl BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat)

15 µl NBT (4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid)

Puffer I:

200 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5

60 ml 5 ml

mit Wasser auf 2 l auffüllen.

Puffer II:

1 g Blockierungsreagenz (Boehringer)

70 ml Puffer I

30 ml FBS

Puffer III:

200 ml 1 M Tris/HCl, pH 9,5

4 ml 0,2 M EDTA

mit Wasser auf 1 l auffüllen.

3 Ergebnisse

3.1 Aufreinigung polyklonaler Antikörper gegen RhoBTB3

3.1.1 Affinitätschromatographische Antikörperaufreinigung

Die GTPase Domäne der RhoBTB3 Isoform ist im Vergleich mit anderen GTPasen in Vertebraten sehr unterschiedlich und wurde daher als Epitop für die Generierung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen verwendet (F. Rivero). Kaninchen wurden mit der Maus vollständigen GTPase Domäne von RhoBTB3 immunisiert. Der hergestellte polyklonale Antikörper erkannte die RhoBTB3-GFP-Fusionsproteine im Western-Blot-Verfahren (Abb. 3.1). Allerdings war ein starker unspezifischer Hintergrund vorhanden, so dass eine Aufreinigung des Antikörpers erforderlich war. Das Antiserum wurde über eine Zyanbromid-Sepharose Säule mit kovalent gekoppelten, rekombinantem RhoBTB3-GTPase Protein aufgereinigt (s. 2.3.4). Nach der Aufreinigung waren die Signale sowohl von der GTPase Domäne als auch von dem vollständigen RhoBTB Protein in der Western-Blot-Analyse deutlich besser vom Hintergrund abzugrenzen.

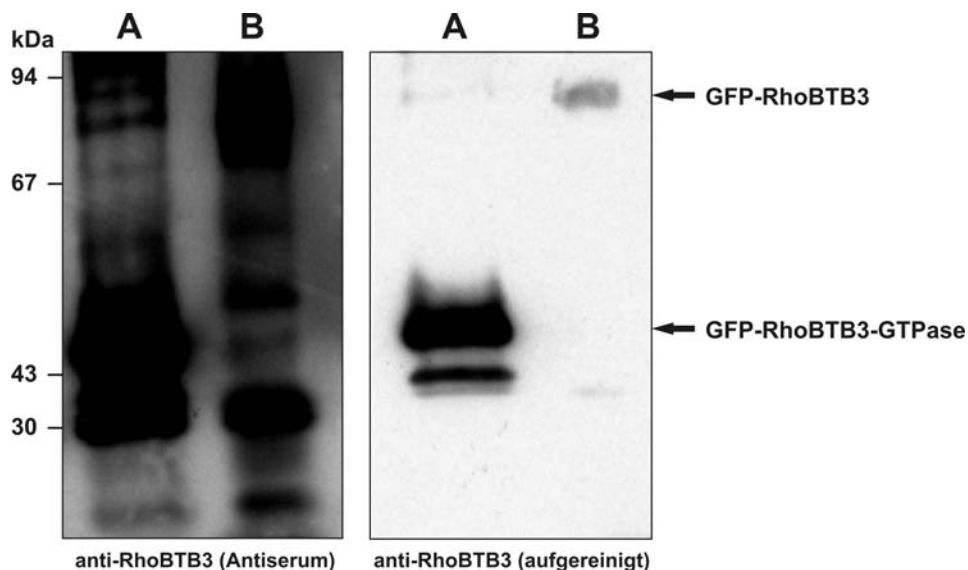


Abbildung 3.1 Antikörperaufreinigung. COS7-Zellen wurden mit Plasmiden GFP-RhoBTB3-GTPase (A) und GFP-RhoBTB3 (vollständige Sequenz; B) transfiziert und die Homogenate mittels 12%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western-Blot-Verfahren erfolgte die Immundetektion mit rohem anti-RhoBTB3-Antiserum und aufgereinigtem anti-RhoBTB3-Antikörper (1:500 verdünnt). Die Bindung der primären Antikörper wurde mit einem sekundären anti-Kaninchen Peroxidasegekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Expositionsdauer betrug in beiden Fällen 15 min.

3.1.2 Überprüfung der Antikörperspezifität

Der hergestellte polyklonale Antikörper ist gegen die GTPase Domäne der RhoBTB3 Isoform der Maus gerichtet. Die RhoBTB Proteine der Maus und des Menschen sind nahezu identisch und eine Kreuzreaktion des Antiserums mit der humanen RhoBTB3 Isoform daher sehr wahrscheinlich. Zur Überprüfung wurde die GTPase Domäne des Menschen sowie der Maus im bakteriellen System zur Expression gebracht (Abb. 3.2, linkes Feld) und mittels Western-Blot analysiert (Abb. 3.2, rechtes Feld). Der RhoBTB3-Antikörper der Maus erkannte das menschliche Protein, jedoch in deutlich schwächerer Form und erst nach einer Expositionszeit von 60 min.

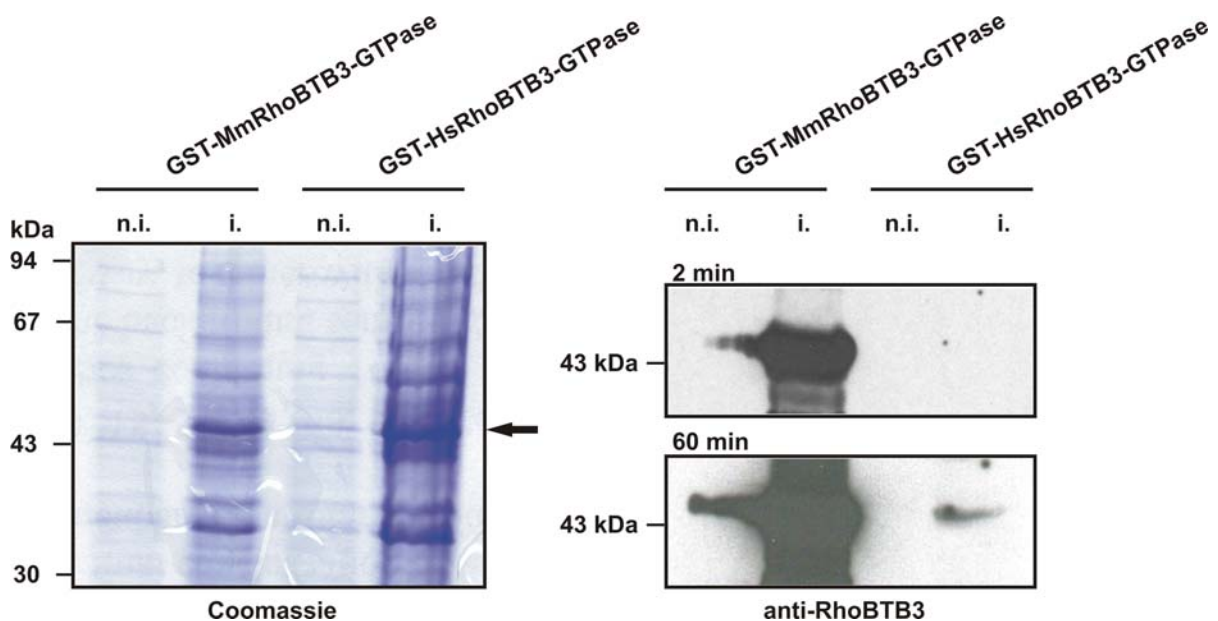


Abbildung 3.2 Überprüfung der Antikörperspezifität. Die GTPase Domäne der RhoBTB3 Isoform des Menschen und der Maus wurde rekombinant als GST-Fusion in Bakterienzellen exprimiert (n.i., nicht induziert; i., induziert). **(A)** Auftrennung der Proteine in einer 12%-igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung (Pfeil markiert exprimierte GTPase Domäne). **(B)** Western-Blot einer 12%-igen SDS-PAGE. Immundetektion mit gereinigtem anti-RhoBTB3-Antikörper. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären anti-Kaninchen Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz (2 min und 60 min).

3.2 Expressionsanalyse der RHOBTB Gene im Gewebe

Die Expressionsmuster der RhoBTB Proteine in verschiedenen Geweben sind durch Northern Blot-Analysen bereits bekannt (Ramos et al., 2002). RhoBTB3 ist in kardialen und neuronalen Geweben stark exprimiert. Folglich wurden immunhistochemische Färbungen zunächst in Herzgewebeschnitten mit dem affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper getestet. Die spezifischen Signale konnten nur schwer von dem Hintergrund unterschieden werden. Es kann sein, dass

die Proteinmengen unterhalb der Detektionsschwelle liegen. Mit verschiedenen Antikörperverdünnungen wurden sowohl Paraffinschnitte als auch Kryoschnitte getestet. Der RhoBTB3-Antikörper ist in der Immunhistochemie nicht zufriedenstellend zu verwenden, obgleich er sehr gute Ergebnisse im Western-Blot erzielt. Um die Expression der RhoBTB Proteine in Geweben dennoch aufzuklären, wurde die *in situ*-Hybridisierung verwendet, die eine noch sensitivere Methode darstellt.

3.2.1 Expression der RHOBTB Gene in Geweben der Maus

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden spezifische Oligonukleotide der drei Isoformen entworfen und mit Digoxigenin am 5'-Ende zur späteren Detektion markiert. Mäuse wurden perfundiert, einzelne Gewebe in Paraffin eingebettet und in 6 μm dicke Schichten geschnitten, bevor sie mit den Oligonukleotiden hybridisiert wurden (vgl. 2.6).

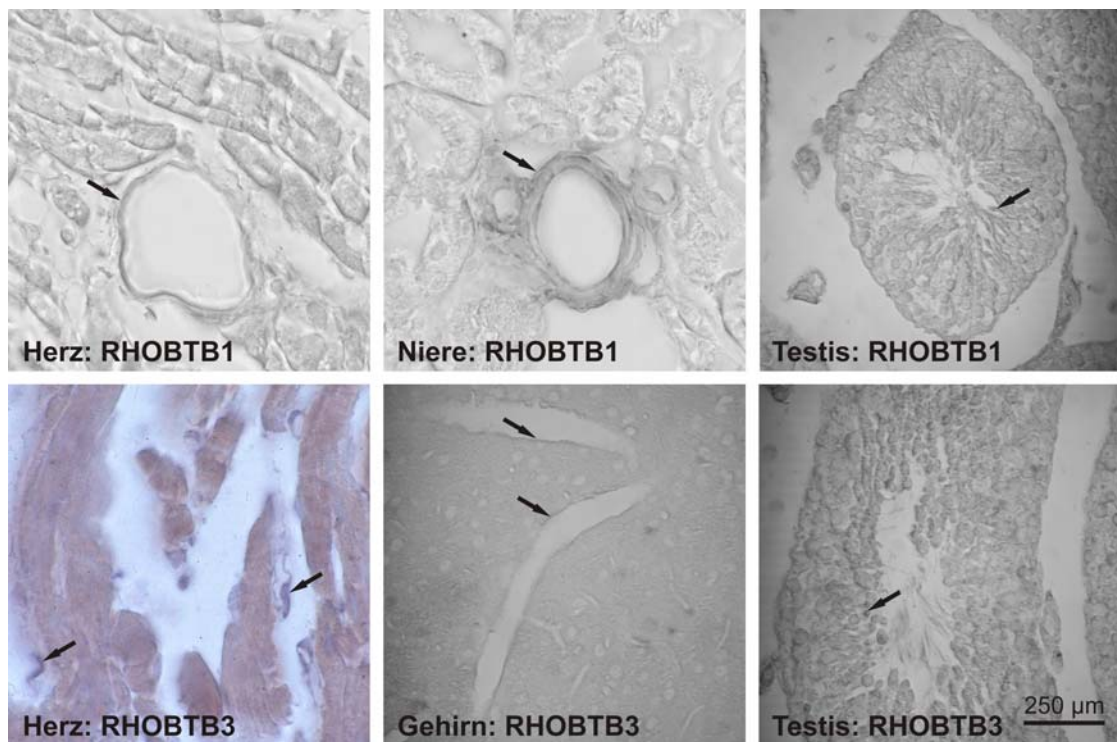


Abbildung 3.3 *In situ*-Hybridisierung von RHOBTB1 und RHOBTB3 in Mausgeweben. Herz-, Niere- und Testisschnitte für RHOBTB1 und Herz-, Gehirn- und Testisschnitte für RHOBTB3 wurden mit spezifischen Digoxigenin-markierten Sonden hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem anti-Digoxigenin-Antikörper. Es sind Hybridisierungen mit Antisense-Oligonukleotiden gezeigt. Die entsprechenden Sense-Oligonukleotide waren negativ. Pfeile markieren positive Endothelzellen und Spermatozyten bzw. Spermatiden.

Die *in situ*-Hybridisierung zeigte eine spezifische Expression von RHOBTB1 und RHOBTB3 in Endothelzellen der Blutgefäße (Abb. 3.3). Im Herz kann RHOBTB3 in Endothelzellen der Kapillaren detektiert werden. In Niere und Herz ist RHOBTB1 im Endothel größerer Gefäße präsent. Zudem sind Spermatozoen und Spermatozyten RHOBTB1- und RHOBTB3-positiv. Im Uterus, in der Lunge und in der Leber konnte keine RHOBTB1- und RhobTB3-Färbung eindeutig identifiziert werden, während für RHOBTB2 in keinem Gewebe eine positive Färbung detektiert werden konnte.

3.2.2 Expression der RHOBTB Gene in einer Endothelzelllinie

RHOBTB1 und RHOBTB3 werden spezifisch in Endothelzellen detektiert. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurden *in situ*-Hybridisierungen an einer Endothelzelllinie durchgeführt. Die Endothelzelllinie ist aus sortierten embryonalen Stammzellen entstanden und wurde von Prof. Dr. W. Bloch zur Verfügung gestellt (Sporthochschule, Köln). Die RHOBTB-spezifische mRNA konnte in dieser Zelllinie mit der *in situ*-Hybridisierung aufgezeigt werden und bestätigte die Expression aller drei RHOBTB Gene in Endothelzellen (Abb. 3.4).

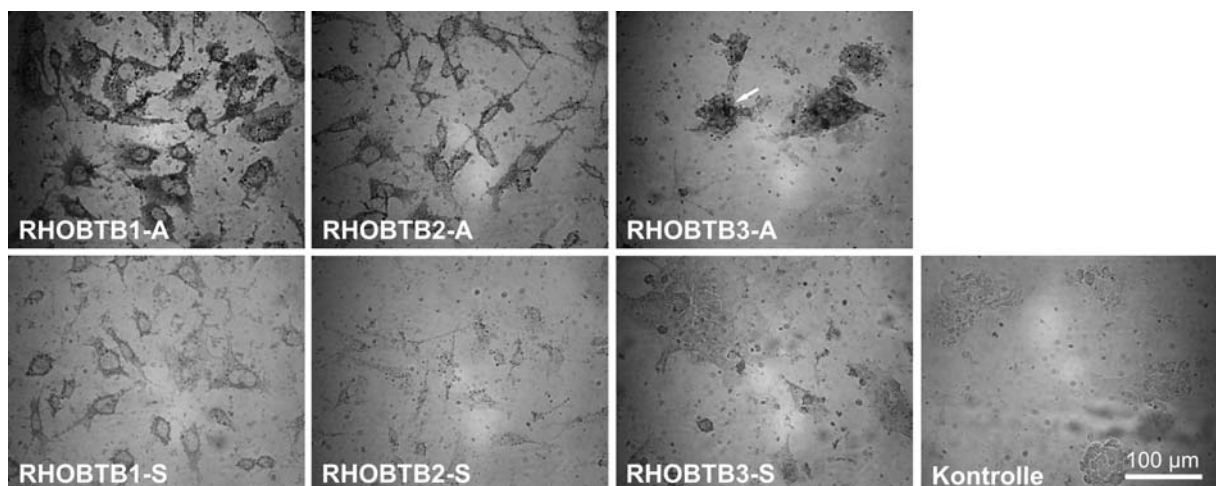


Abbildung 3.4 *In situ*-Hybridisierung von RHOBTB in einer Endothelzelllinie. Eine MACS-sortierte Endothelzelllinie wurde mit spezifischen Digoxigenin-markierten Sonden für RHOBTB1, RHOBTB2 und RHOBTB3 hybridisiert. Dabei können nur die Antisense-Oligonukleotide (A) mit der mRNA hybridisieren, während die Sense-Oligonukleotide (S) als Kontrolle der Spezifität dienen. Die Detektion erfolgte mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem anti-Digoxigenin-Antikörper. Eine Kontrolle ohne Oligonukleotide ist zusätzlich gezeigt. RHOBTB3 zeigt in bereits differenzierten Endothelzellklastern (Pfeil) stärkere Signale als in einzelnen Zellen.

Die immunhistochemische Detektion von RhobTB3 in derselben Zelllinie zeigte vergleichbare Färbungen (Abb. 3.5). Auffällig bei den Detektionen in dieser

Endothelzelllinie war, dass die RhoBTB3 Färbung in bereits differenzierten Zellanhäufungen intensiver auftrat als in isolierten Zellen. Möglicherweise sind RhoBTB3 Proteine an der Regulation der Angiogenese beteiligt.

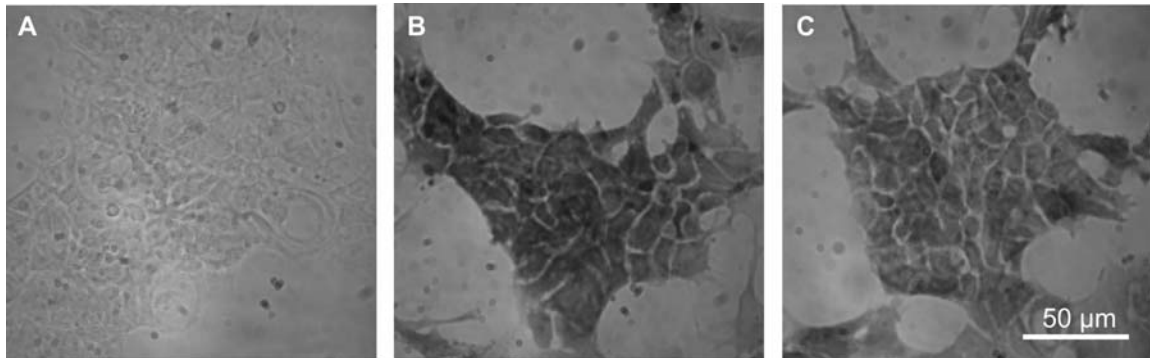


Abbildung 3.5 Immunhistochemische Detektion von RhoBTB3 in einer Endothelzelllinie. Eine MACS-sortierte Endothelzelllinie wurde mit anti-RhoBTB3 Antikörper inkubiert und anschließender Diaminobenzidin-Reaktion detektiert. (A) Kontrolle ohne anti-RhoBTB3-Antikörper, (B) anti-RhoBTB3 1:500 verdünnt und (C) anti-RhoBTB3 1:4000 verdünnt.

3.3 RhoBTB Proteine können Dimere ausbilden








In funktioneller Hinsicht ist die BTB Domäne häufig als Protein-Protein-Interaktionsmodul tätig und bewirkt sowohl Assoziation mit sich selbst als auch Interaktion mit Proteinen ohne BTB Domänen (Stogios et al., 2005). Aufgrund der hohen Ähnlichkeiten der BTB-beinhaltenen Proteine, die zusätzliche Domänen enthalten, ist anzunehmen, dass auch RhoBTB Proteine Dimere ausbilden können.

3.3.1 Homodimerisierung

Homodimerisierung ist für BTB-Zink-Finger Proteine mit N-terminalen Erweiterungen bekannt. Da auch die BTB Domänen der RhoBTB Proteine ähnliche Erweiterungen, der so genannten BTB-Faltung am N-Terminus aufzeigen, ist eine Interaktion mit sich selbst wahrscheinlich. Um dies zu überprüfen, wurde die direkte Interaktion *in vivo* im Hefe Hybrid-System getestet. Dafür wurden Hefepasmide mit dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB3, dem Tandem aus BTB Domänen und einzelnen Domänen von RhoBTB3 eingesetzt, die für Fusionsproteine mit der Aktivierungsdomäne bzw. der Bindungsdomäne des LacZ-Reportergens kodieren (vgl. 2.1.9.1). Die Plasmide wurden in die Hefestämme Y187 und Y190 transformiert und mittels Hefepaarung vereint. Die positiven Klone wurden einem β -

Galaktosidasetest unterzogen. Hefepasmide, die die vollständige Sequenz für RhoBTB2 enthielten, zeigten eine leichte Autoaktivierung und konnten nur mit Vorsicht betrachtet werden, während das Hefepasmid mit der vollständigen Sequenz für RhoBTB3 im Hefesystem negativ war (nicht gezeigt). Der C-terminale Bereich von RhoBTB3 (B1B2C) zeigte Homodimerisierung (Tab. 3.1). Die Dimerbildung findet vermutlich durch BTB Domänen statt, die ebenfalls als Tandem-Konstrukt eine Blaufärbung aufwiesen. Einzelne Domänen, die den Interaktionsbereich weiter einengen sollten, zeigten keine Signale. Eine RhoBTB2 Homodimerisierung konnte mit Hefekonstrukten nachgewiesen werden, die jeweils die vollständige Sequenz trugen (nicht gezeigt).

Tabelle 3.1 Homodimerisierung und Heterodimerisierung von RhoBTB3.

pAS \ pACT	RhoBTB3-B1B2C 	RhoBTB3-B1B2 
RhoBTB3-B1B2C 	+++	+
RhoBTB3-B1 	-	-
RhoBTB3-B2 	-	-
RhoBTB3-C 	-	-
RhoBTB2 	+++	++

Verschiedene RhoBTB3 Domänen wurden in die entsprechenden Hefevektoren kloniert. RhoBTB3-B1B2C enthält die BTB1, BTB2 und C-terminale Domäne, RhoBTB3-B1B2 das BTB Tandem und RhoBTB3-B1, RhoBTB3-B2 und RhoBTB3-C, die jeweils einzelne Domänen. RhoBTB2 umfasst die vollständige Sequenz. Das Hefe Hybrid-System zeigte starke Interaktion des C-terminalen Bereichs (B1B2C) von RhoBTB3 mit sich selbst und mit der vollständigen Sequenz von RhoBTB2. + bezeichnet die relative Intensität der Blaufärbung, - bezeichnet keine Blaufärbung.

3.3.2 Heterodimerisierung



Die RhoBTB Familie enthält drei Isoformen. Aufgrund der Ähnlichkeit der Proteine ist eine heterodimere Bindung untereinander vorzustellen. Um dies zu überprüfen, wurden Hefepasmide mit dem C-terminalen Bereich (B1B2C), dem Tandem aus BTB Domänen von RhoBTB3 sowie RhoBTB2 mit vollständiger Sequenz eingesetzt,

die für Fusionsproteine mit der Aktivierungsdomäne bzw. der Bindungsdomäne des LacZ-Reportergens kodieren (vgl. 2.1.9.1). Wie in Abschnitt 3.3.1 dargestellt, wurde das Hefe-Hybrid System angewandt. RhoBTB3 zeigt durch BTB Domänen eine Dimerisierung mit RhoBTB2 (Tab. 3.1). Die einzelnen RhoBTB3 Domänen zeigten auch mit RhoBTB2 im Test keine Interaktionen. Möglicherweise sind beide Domänen für ein Dimer erforderlich oder die Interaktionssignale liegen unter der detektierbaren Grenze. Hefepiasmide, die die vollständige Sequenz für RhoBTB1 enthielten, funktionierten in diesem Verfahren nicht (nicht gezeigt).

3.3.3 Intramolekulare Interaktion

In den Hefe Hybrid-Studien wurde nicht nur der C-terminale Bereich (B1B2C) von RhoBTB3 mit sich selbst, sondern auch die GTPase Domäne auf Interaktion getestet. Überraschenderweise konnte eine Interaktion der GTPase mit dem C-terminalen Bereich (B1B2C) festgestellt werden (Tab 3.2).

Tabelle 3.2 Intramolekulare Interaktionen der RhoBTB Proteine.

pAS \ pACT	RhoBTB2- GTPase	RhoBTB3- GTPase	Cdc42- wt/N17/V12	RhoA- wt/N17/V12	Rac1- wt/N17/V12
RhoBTB3-B1B2C 	+++	+++	-	-	-
RhoBTB3-B1B2 	+	++	-	-	-

Verschiedene GTPase Domänen von RhoBTB2, RhoBTB3 und anderen GTPasen, sowohl als Wildtyp als auch in der konstitutiv aktiven und dominant negativen Form, wurden in Hefevektoren kloniert. Mit Hilfe des Hefe Hybrid-Systems konnte eine Interaktion der GTPase Region des RhoBTB2 und RhoBTB3 Proteins mit der C-terminalen Region von RhoBTB2 gezeigt werden. + bezeichnen die relative Intensität der Blaufärbung, - bezeichnet keine Blaufärbung. Die Hefepiasmide von Cdc42, RhoA und Rac1 wurden freundlicherweise von F. Rivero zur Verfügung gestellt.

In weiteren Analysen zeigte es sich, dass die Interaktion für RhoBTB2 und RhoBTB3 auf die BTB Domänen eingeschränkt werden konnte. Daraufhin wurden Hefe Hybrid-Analysen mit der GTPase Domäne von RhoBTB2 und anderen Rho GTPasen (Cdc42, RhoA und Rac1 sowohl in der Wildtypform als auch in der konstitutiv aktiven und dominant negativen Form) durchgeführt (vgl. 2.1.9.1). Es zeigte sich, dass nur die GTPase Domäne der RhoBTB Proteine mit dem C-terminalen Bereich (B1B2C)

interagieren kann und zur intramolekularen Interaktion befähigt ist (Tab. 3.2). Die anderen kleinen GTPasen können nicht mit dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB3 interagieren.

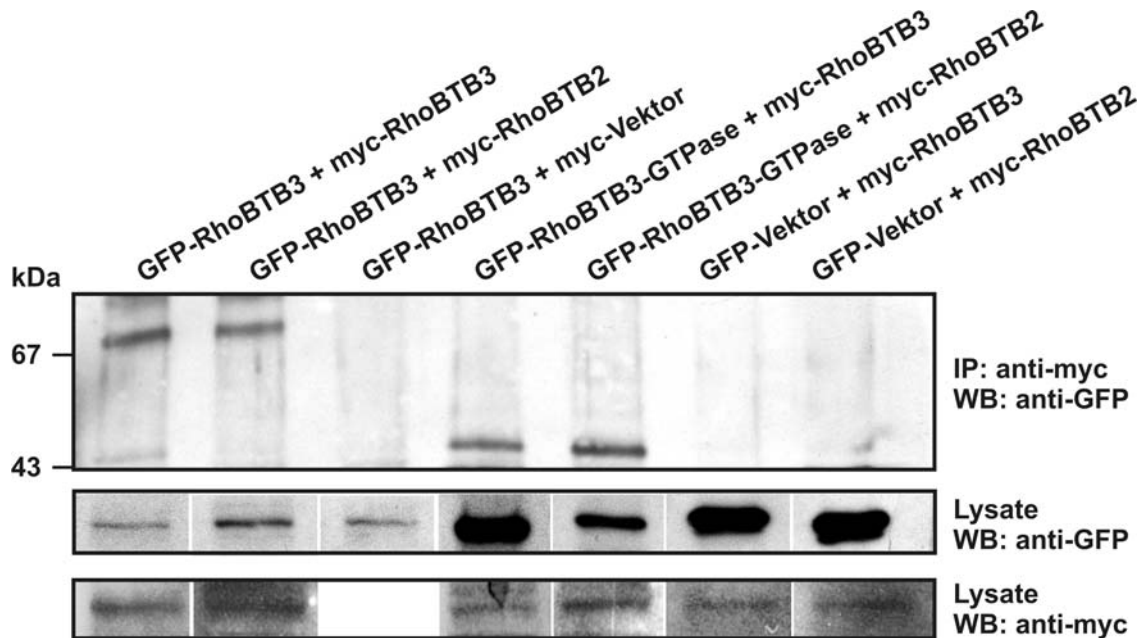


Abbildung 3.6 RhoBTB Proteine bilden Homo- und Heterodimere *in vivo*. COS7-Zellen wurden mit RhoBTB als GFP-Fusionen und myc-Fusionen transfiziert, mit anti-myc-Antikörper immunpräzipitiert und im Western-Blot nach 12%-iger SDS-PAGE mit Antikörper gegen GFP analysiert. Die Lysate wurden als Expressionskontrolle mit anti-GFP und anti-myc überprüft und die entsprechenden Bereiche ausgeschnitten und dargestellt. RhoBTB Proteine können *in vivo* homo- und heterodimerisieren. Interaktion zwischen der GTPase Domäne von RhoBTB3 mit den vollständigen RhoBTB2 und RhoBTB3 Proteinen ist sichtbar.

Die Dimerisierung von RhoBTB3 sowohl mit sich selbst als auch mit RhoBTB2 ließ sich *in vivo* mittels Koimmunpräzipitation bestätigen (Abb. 3.6). Sowohl das RhoBTB2 als auch RhoBTB3 konnte mit RhoBTB3 immunpräzipitiert werden. Zusätzlich konnte eine Interaktion der GTPase Domäne von RhoBTB3 mit den vollständigen RhoBTB2 und RhoBTB3 Proteinen festgestellt werden. Ebenso wie die GTPase von RhoBTB3 kann die GTPase Domäne von RhoBTB2 mit dem vollständigen RhoBTB3 Proteine interagieren (nicht gezeigt). RhoBTB Proteine können durch diese intramolekulare Bindung möglicherweise reguliert werden.

3.3.4 RhoBTB2 kolokalisiert mit RhoBTB3

Ein weiterer Ansatz bestand darin, die beiden Proteine gleichzeitig zu exprimieren und mit Immunfluoreszenzaufnahmen zu analysieren. Ausgehend von der bekannten

Heterodimerisierung von RhoBTB2 und RhoBTB3 aus Hefe Hybrid-Analysen und Koimmunpräzitationsstudien in vorhergehenden Abschnitten wurde eine Kolokalisation erwartet. In der Tat zeigt sich eine eindeutige Kolokalisation von RhoBTB2 als GFP-Fusion und RhoBTB3 als Flag-Fusion, visualisiert mit fluoreszierenden anti-Flag Zweitantikörpern (vgl. 2.1.9.2). In beiden Fällen zeigten die Proteine fast identische punktförmige Strukturen um den Nukleus (Abb. 3.7).

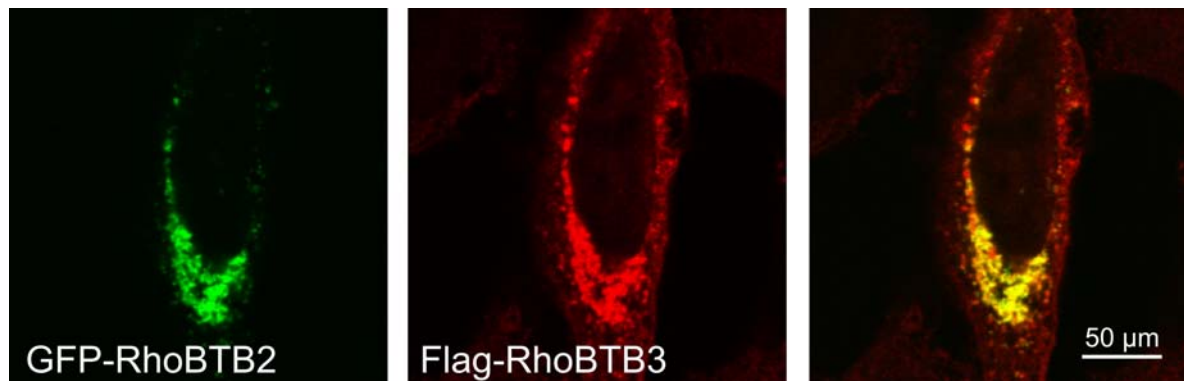


Abbildung 3.7 RhoBTB2 kolokalisiert mit RhoBTB3. COS7 Zellen wurden mit RhoBTB Konstrukten als GFP- und Flag-Fusionen transfiziert, nach einem Tag mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-Flag Antikörper gefärbt (sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 568). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop aufgenommen. RhoBTB2 zeigt Kolokalisation mit RhoBTB3.

3.3.5 Kartierung der Dimerisierungsdomäne von RhoBTB

Um die Bereiche der RhoBTB Proteine, die für eine Dimerisierung erforderlich sind, weiter einzuschränken, wurden Immunpräzitationen mit einzelnen Domänen durchgeführt (vgl. 2.1.9.2; Abb. 3.8). Dabei wurde ersichtlich, dass sowohl das Tandem der BTB Domänen (B1B2) als auch die BTB1 und die BTB2 Domäne alleine von RhoBTB3 mit dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB2 *in vivo* interagieren kann. Dies steht im Gegensatz zu den Hefe Hybrid-Analysen, in denen keine Bindung einer einzelnen Domäne detektiert werden konnte. Möglicherweise entstehen in Säugetierzellen größere Komplexe, die diese Interaktionen stabilisieren oder sogar erfordern.

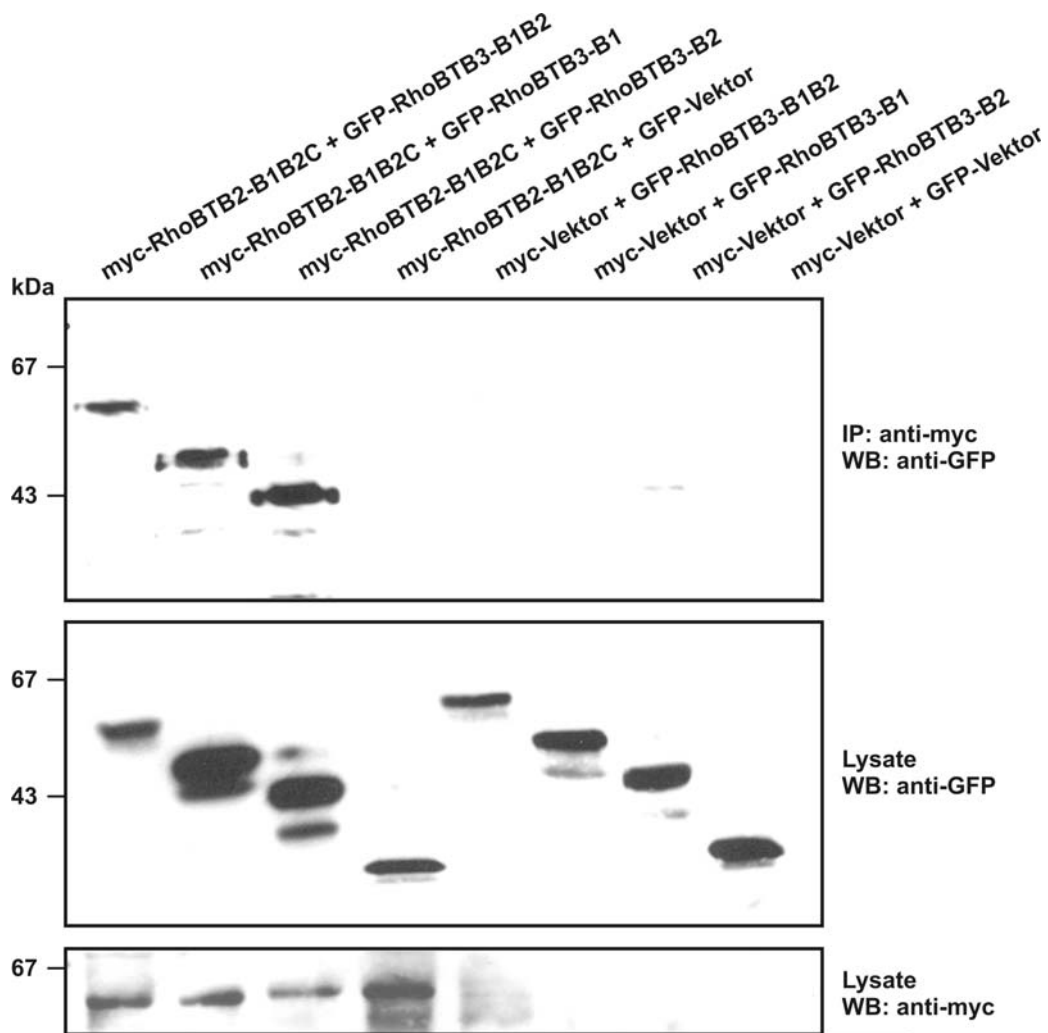


Abbildung 3.8 Kartierung des Bereichs der RhoBTB Heterodimerisierung. COS7-Zellen wurden mit RhoBTB2-B1B2C als myc-Fusion und die BTB1 (B1), BTB2 (B2) und beide Domänen von RhoBTB3 als myc-Fusionen transfiziert, mit anti-myc-Antikörper immunpräzipitiert und nach 12%-iger SDS-PAGE mittels Western-Blot mit Antikörper gegen GFP analysiert. Die Lysate wurden als Expressionskontrolle mit anti-GFP und anti-myc überprüft. Beide BTB Domänen von RhoBTB3 können *in vivo* mit dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB2 interagieren.

3.4 Abbau der RhoBTB Proteine durch das Proteasom

Die Detektion von RhoBTB Proteinen in Säugetierzellen mit Western-Blot-Analyse stellte sich selbst mit überexprimiertem GFP-fusionierten RhoBTB3 als schwierig dar. Der Versuch, stabile Zelllinien mit exprimierendem RhoBTB3 Protein herzustellen, schlug fehl. Eine mögliche Erklärung lieferten Veröffentlichungen, die BTB Domänen eine Beteiligung in Cullin3-abhängigen Ubiquitin Ligase-Komplexen zuwiesen. In diesen Komplexen könnte auch das BTB Domänen-beinhaltenende Protein ubiquitiniert und abgebaut werden. Um den Abbau der RhoBTB Proteine zu untersuchen, wurden COS7 Säugerzellen mit RhoBTB3 als GFP-Fusionsprotein transfiziert und mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt. MG132 blockiert den unspezifischen Abbau

aller Proteine durch das 26S-Proteasom (Abb. 3.9, A). Nach 24 Stunden Behandlung konnte eine eindeutige Akkumulation des Fusionsproteins im Fluoreszenzmikroskop festgestellt werden. Die Akkumulation des RhoBTB3-Fusionsproteins mit GFP durch die Blockierung des Proteasoms konnte auch nach verschiedenen Zeitintervallen im Western-Blot-Verfahren nachgewiesen werden (Abb. 3.9. B).

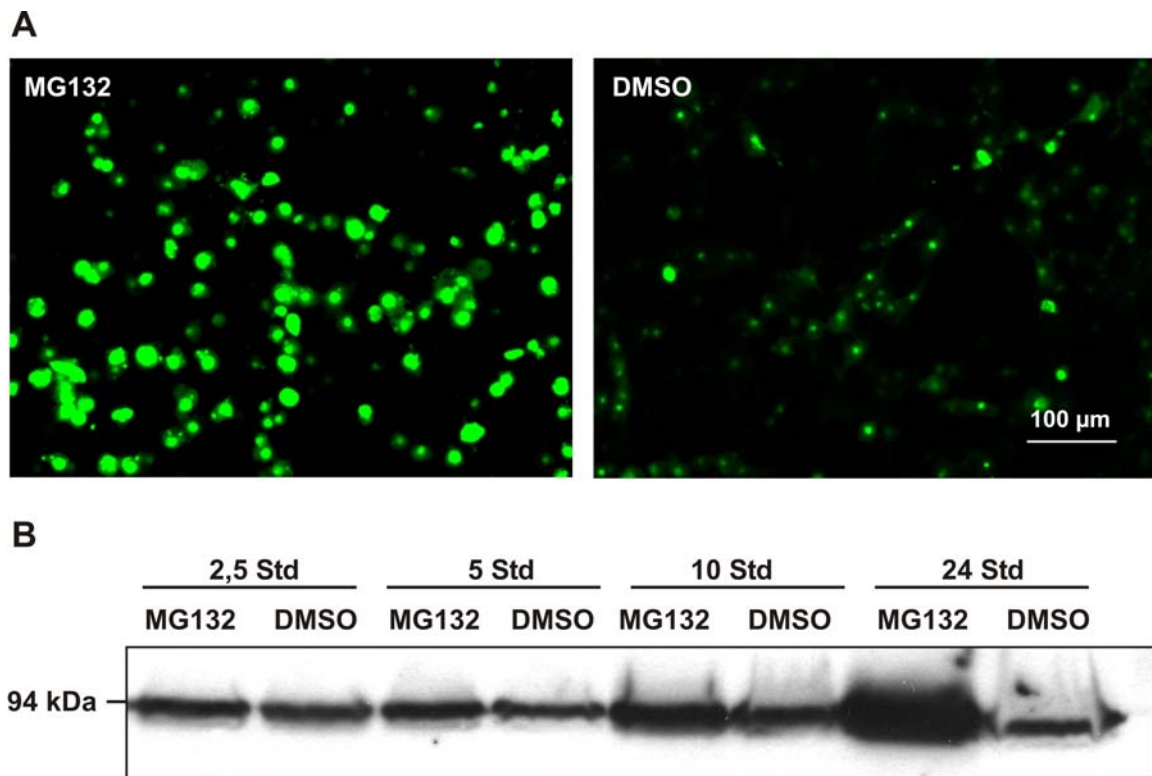


Abbildung 3.9 Abbau von RhoBTB3 durch das 26S-Proteasom. (A) COS7-Zellen wurden mit RhoBTB3 als GFP-Fusionsprotein transfiziert und sowohl mit dem Proteasominhibitor MG132 (5 μ M) als auch mit DMSO als Kontrolle behandelt. Nach 24 Stunden zeigt sich eine Akkumulation des Fusionsproteins im Fluoreszenzmikroskop. (B) COS7-Zellen wurden mit RhoBTB3 als GFP-Fusionsprotein transfiziert und mit MG132 (10 μ M) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Homogenate wurden an verschiedenen Zeitpunkten gesammelt und nach 12%-iger SDS-PAGE im Western-Blot mit anti-GFP-Antikörper analysiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären anti-Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz.

3.5 Intramolekulare Interaktion verhindert Abbau der RhoBTB Proteine

Um die intramolekulare Interaktion der RhoBTB Proteine (vgl. 3.3.3) näher zu untersuchen, wurden COS7-Zellen sowohl nur mit der GTPase Domäne und nur dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB3 transfiziert als auch mit beiden Domänen kotransfiziert (vgl. 2.1.9.2). Lysate wurden im Western-Blot-Verfahren mit Antikörpern gegen GFP und myc zur Detektion der Domänen analysiert (Abb. 3.10). Die Kotransfektion mit der GTPase Domäne resultiert in einer Anreicherung des C-terminalen Bereichs (B1B2C). Dieser Befund führt zu der Hypothese, dass die GTPase Domäne von RhoBTB3 die BTB Domänen bindet und somit die Bildung von Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligasekomplexen blockiert und somit der Abbau sowie die Ubiquitinierung der RhoBTB Proteine und möglicherweise anderer Proteine verhindert wird.

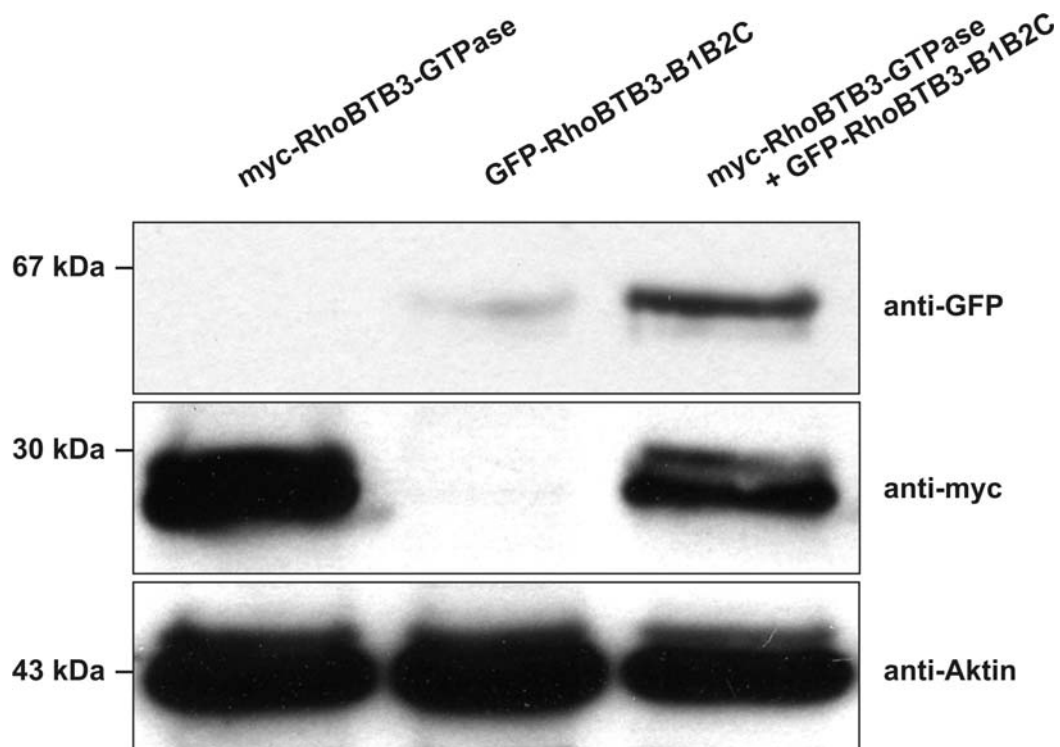


Abbildung 3.10 Intramolekulare Interaktion verhindert Abbau der RhoBTB Proteine. COS7-Zellen wurden mit der myc-fusionierten GTPase Domäne, der GFP-fusionierten C-terminalen Domäne (B1B2C) oder beiden Domänen von RhoBTB3 transfiziert. Lysate wurden nach 12%-iger SDS-PAGE im Western-Blot mit Antikörper gegen GFP und myc für die Detektion der Domänen analysiert. Die Inkubation mit Antikörper gegen Aktin diente als Auftragungskontrolle. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären anti-Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. Kotransfektion mit der GTPase Domäne führt zu einer Anreicherung der C-terminalen Domäne (B1B2C) von RhoBTB3.




3.6 Interaktion der RhoBTB Proteine mit Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexen

Die Rolle der RhoBTB Proteine in der Ausbildung von Cullin3-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexen ist von entscheidender Bedeutung, um die Funktion der RhoBTB Proteine zu entschlüsseln. RhoBTB Proteine könnten - wie in Veröffentlichungen für andere BTB Domänen-beinhalten Proteine gezeigt - als Adaptoren für Substratspezifität fungieren und den Abbau der Substrate regulieren.

3.6.1 Interaktion mit Cullinen

Für Hefe-Hybridanalysen wurden alle Cullin Proteine in die entsprechenden Hefevektoren kloniert und getestet (vgl. 2.1.9.1). Die Interaktion der RhoBTB GTPasen im Hefe Hybrid-System zeigte sich mit Cullin3 und überraschenderweise mit Cullin5 (Tab. 3.3). Die Interaktion beschränkte sich auf den C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB3, während die GTPase Domäne nicht interagierte. RhoBTB2 zeigte ebenfalls mit Cullin3 und Cullin5 eine Bindung, die jedoch noch nicht weiter eingeschränkt werden konnte. Eine trunkierte Version von Cullin3, der die ersten 41 Aminosäuren fehlen, grenzte die Interaktion auf den N-terminalen Bereich ein.

Tabelle 3.3 RhoBTB Proteine interagieren mit Cullin Ligasen.

pAS \ pGADT7	RhoBTB2	RhoBTB3-B1B2C	RhoBTB3-GTPase
			
Cullin1	-	-	-
Cullin2	-	-	-
Cullin3	+++	++	-
Cullin3ΔN41	-	-	-
Cullin4	-	-	-
Cullin5	+++	++	-

Die Interaktion zwischen der kompletten RhoBTB2 Isoform und RhoBTB3 Isoform - unterteilt in GTPase und C-terminale (B1B2C) Domäne - mit Cullinen wurde im Hefe Hybrid-System untersucht. Cullin Δ N41 fehlen die ersten 41 Aminosäuren am N-Terminus. Für beide RhoBTB Proteine konnte sowohl Interaktion mit Cullin3 als auch Cullin5 detektiert werden. + bezeichnet die relative Intensität der Blaufärbung, - bezeichnet keine Blaufärbung.

Die Ergebnisse des Hefe Hybrid-Verfahrens sollten *in vivo* mit Koimmunpräzitationen bestätigt werden. Hierfür wurden COS7-Zellen mit Cullinen als myc-Fusionen und RhoBTB2 sowie RhoBTB3 als Flag-Fusionen transfiziert und die Cullin Komplexe mit anti-Flag präzipitiert. Hierbei wurden Interaktionen der RhoBTB2 Proteine nur mit Cullin3, jedoch für RhoBTB3 mit Cullin1, Cullin3, Cullin4 sichtbar (Abb. 3.11). In weiteren Koimmunpräzitationen war eine Interaktion von RhoBTB3 mit unterschiedlichen Cullinen festzustellen. In einem Experiment konnte auch eine Interaktion mit RhoBTB3 mit Cullin2 und Cullin5 erfolgen, die in dem Immunpräzipitat der Abbildung 3.11 möglicherweise schwach detektiert werden kann. Die Ergebnisse sind sehr inkonsistent und weichen von den Daten der Hefe Hybrid-Analysen ab.

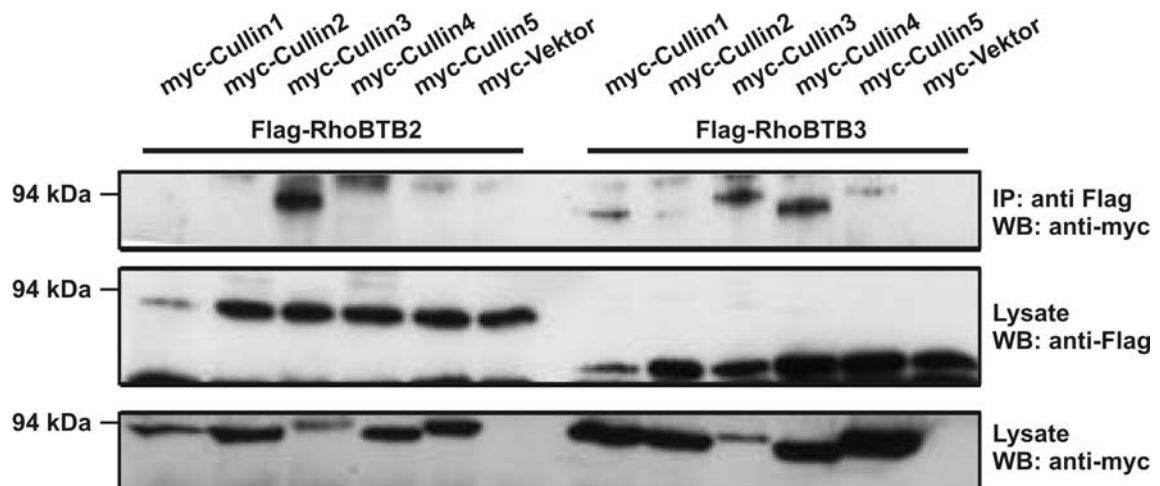


Abbildung 3.11 RhoBTB Proteine interagieren mit Cullinen *in vivo*. COS7-Zellen wurden mit RhoBTB als Flag-Fusionen und Cullin1 bis 5 als myc-Fusionen transfiziert, mit anti-Flag-Antikörper immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE im Western-Blot mit Antikörper gegen myc analysiert. Die Lysate wurden als Expressionskontrolle mit anti-Flag und anti-myc überprüft. RhoBTB Proteine können *in vivo* mehrere Culline binden. Die Immunpräzipitation wurde von P. Aspenström durchgeführt und die Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Ein weiterer Ansatz sollte klären, ob sich dieses Verhalten auch mit der Lokalisation der Proteine in der Zelle deckt. Mit Doppelfärbungen kann eine Kolo-kalisation bestätigt oder ausgeschlossen werden. In Immunfluoreszenzaufnahmen von überexprimierten RhoBTB Proteinen und Cullinen in COS7 Zellen, die auch für die Koimmunpräzitationen benutzt wurden, zeigte sich bei Cullin1 bis Cullin5 eine Kolo-kalisation in den untersuchten Zellen (Abb. 3.12). Selbst mit Cullin3, dem die N-terminale Bindungsdomäne fehlt (Cul3 Δ N41), ist eine Kolo-kalisation zu erkennen, die nur mit Wechselwirkungen mit anderen Cullinen innerhalb der Zelle zu erklären ist.

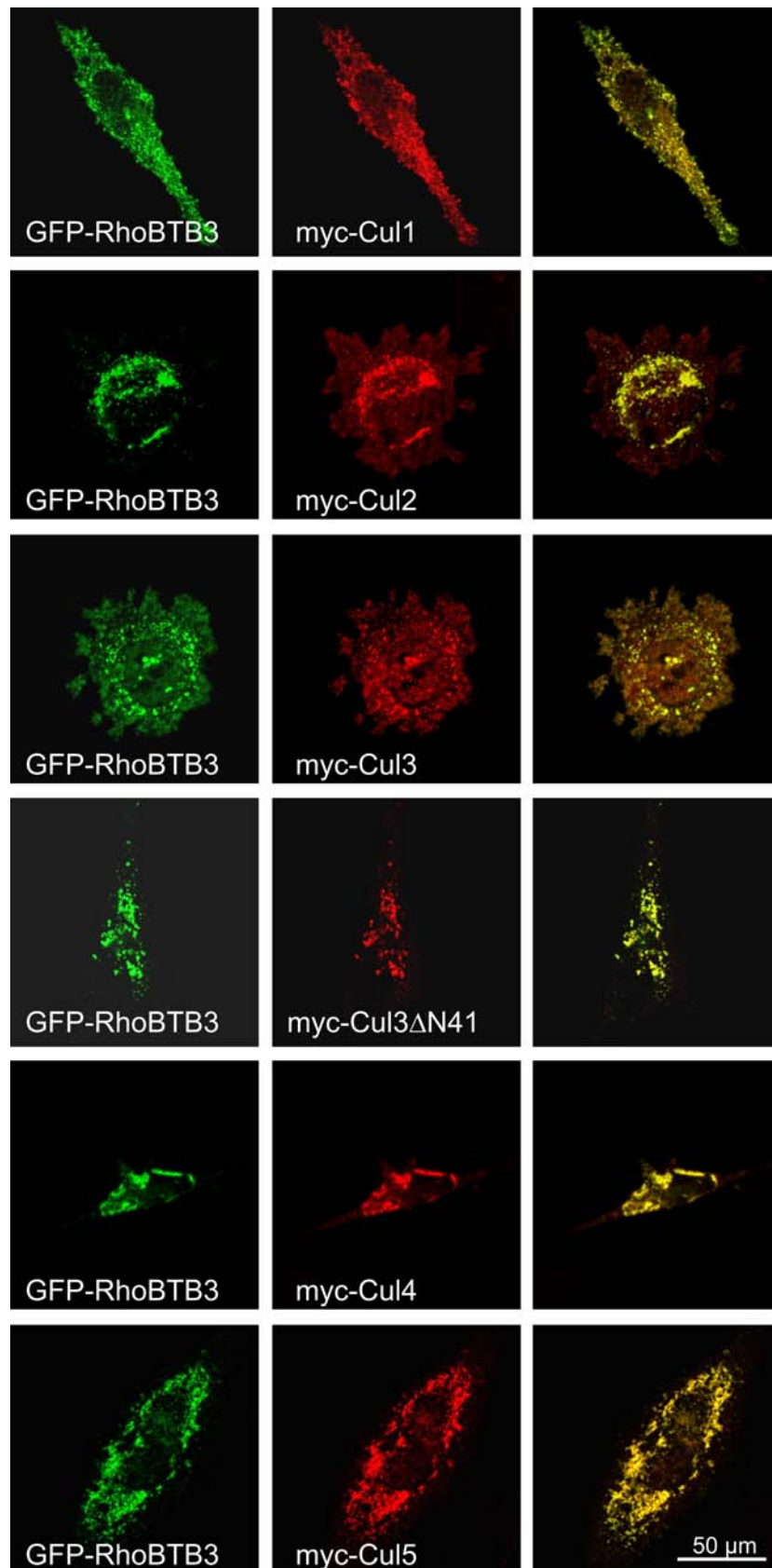


Abbildung 3.12 Verteilung von RhoBTB und Cullinen in der Zelle. COS7-Zellen wurden mit RhoBTB3 als GFP-Fusionen und Cullin1 bis 5 als myc-Fusionen transfiziert, nach einem Tag mit Paraformaldehyd fixiert, mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert und gefärbt (sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 568). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop aufgenommen. Kolokalisation war in allen Fällen sichtbar.

3.6.2 Interaktion mit dominant negativen Cullinen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass RhoBTB Proteine mit mehreren Cullinen eine Bindung eingehen. Ob diese Interaktion *in vivo* direkt oder indirekt infolge größerer Komplexbindung erfolgt, ist bisher nicht gezeigt. Dieser Aspekt sollte mit Hilfe von dominant negativen (DN) Cullinen näher untersucht werden. Dominant negativen Cullinen fehlt die katalytische Domäne am C-Terminus und sie können keine Ligase-Aktivität ausüben. Immunpräzipitationen mit überexprimierten RhoBTB Proteinen und dominant negativen Cullinen (1 bis 5) resultiert in einer Bindung von Cullin3 und RhoBTB2 bzw. RhoBTB3 (Abb. 3.13). Dieses Ergebnis konnte mit Immunpräzipitationsstudien ermittelt werden, die entweder RhoBTB Proteine mit Cullinen oder Cullin Proteine mit RhoBTB (Abb. 3.13) präzipitieren. Das bedeutet, dass nur Cullin3 über den N-Terminus – wie auch in Hefestudien gezeigt – mit RhoBTB eine direkte Interaktion eingehen kann. Hingegen können sich größere Komplexe mit weiteren Cullinen nur bei vollständiger Cullin3 Komponente bilden. Diese indirekten Interaktionen vergrößern die regulatorischen Möglichkeiten der RhoBTB abhängigen Ubiquitinierungsprozesse und erhöhen ihre Komplexität.

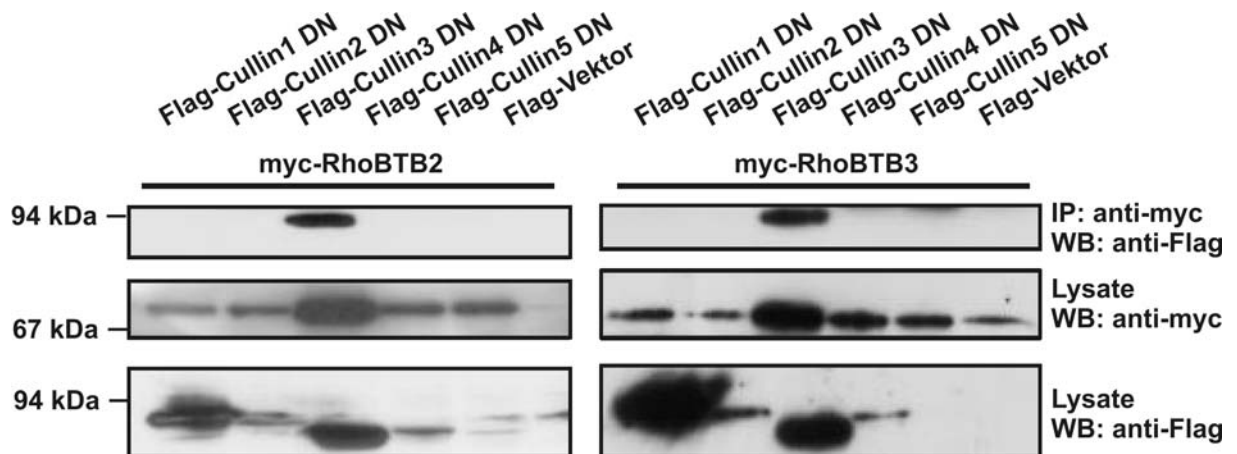


Abbildung 3.13 RhoBTB Proteine interagieren direkt mit Cullin3 *in vivo*. COS7 Zellen wurden mit RhoBTB als myc-Fusionen und dominant negativen (DN) Cullin1 bis 5 als Flag-Fusionen transfiziert, mit anti-myc-Antikörper immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE im Western-Blot mit Antikörper gegen Flag analysiert. Die Lysate wurden als Expressionskontrolle mit anti-Flag und anti-myc überprüft. RhoBTB Proteine können *in vivo* nur mit Cullin3 eine direkte Bindung eingehen. Die Immunpräzipitation wurde von P. Aspenström durchgeführt und die Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zusammen mit den Ergebnissen der Hefe-Analysen und den Koimmunpräzipitationen mit vollständigen Cullinen und dominant negativen Cullinen entstand die Vermutung, dass nur durch ein vollständiges Cullin3 die Anlagerung

weiterer Culline ermöglicht wird. Um diesen Ansatz zu überprüfen, wurden Transfektionen mit RhoBTB Proteinen und dominant negativen Cullinen durchgeführt. Eine Kolokalisation von RhoBTB mit DN Cullin3 war zu erwarten, da in den Koimmunpräzitationen eine Interaktion bereits gefunden wurde. Hingegen sollten die anderen DN Culline nicht in der Lage sein, mit RhoBTB zu interagieren. Überraschenderweise konnte mit Doppelfärbungen eine Kolokalisation für alle DN Cullinen in PAE-Zellen (*porcine aortic endothelial*) nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Interaktion von RhoBTB, Cullinen und sehr wahrscheinlich eine Reihe von Substraten scheint sehr komplex zu sein und muss noch viel detaillierter untersucht werden. Die Tatsache, dass alle Mitglieder der Cullin Familie in bekannten Regulationsvorgängen in der Zelle beteiligt sind und die RhoBTB Proteine verschiedene Domänen für mögliche Regulationsmechanismen besitzen, zeigt nur Teilaspekte der Komplexität auf.

3.6.3 Die erste BTB Domäne bindet Cullin3

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die Interaktion von RhoBTB mit Cullin3 genauer untersucht werden. Im Hefe Hybrid System konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von RhoBTB2 mit Cullin3 durch die BTB1 Domäne erfolgt (Wilkins et al., 2004). RhoBTB2 und RhoBTB3 können beide eine direkte Interaktion mit Cullin3 eingehen (Abschnitt 3.6.2). Weiterhin konnten wir zeigen, dass zumindest RhoBTB3 indirekt eine weitere Bindung mit anderen Cullinen eingehen kann. Es stellte sich nun die Frage, mit Hilfe welcher Domäne RhoBTB3 an Cullin3 bindet. Verschiedene BTB Domänen-enthaltende Proteine wurden mit Cullin3 einer Immunpräzitation unterzogen (vgl. 2.1.9.2). Alle Konstrukte, die die erste BTB Domäne enthalten, wurden mit Cullin3 immunpräzitiert, während die GTPase Domäne, die zweite BTB Domäne und der C-Terminus zu dieser Interaktion nicht befähigt sind (Abb. 3.14). Schlussfolgernd beschränkt sich die Interaktion von RhoBTB3 mit Cullin3 auf die BTB1 Domäne. Die unspezifische Bande mit einer Größe von 45 kDa ist in allen Präzitationen vorhanden und entspricht sehr wahrscheinlich der leichten Antikörperkette.

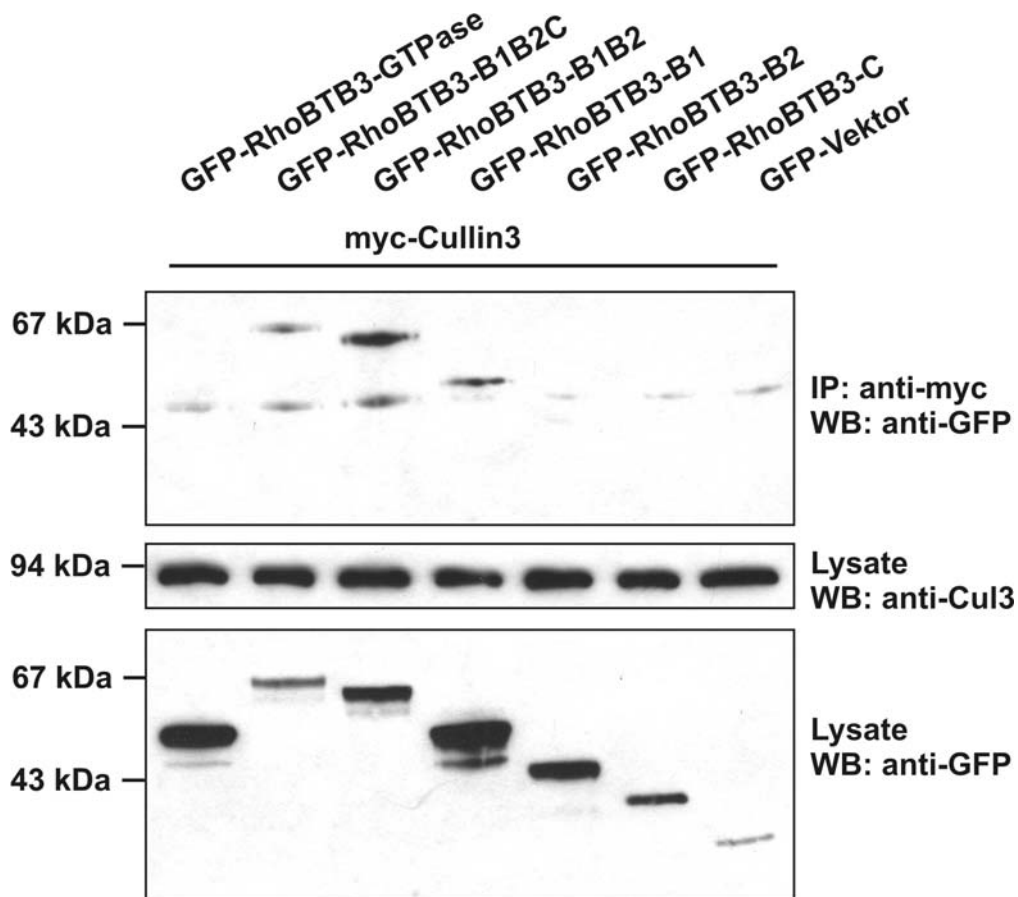


Abbildung 3.14 RhoBTB Proteine interagieren mit Cullin3 über BTB1. COS7 Zellen wurden mit verschiedenen Domänen von RhoBTB als GFP-Fusionen und Cullin3 als myc-Fusionen transfiziert, mit anti-myc-Antikörper immunpräzipitiert und nach 12%-iger SDS-PAGE im Western-Blot mit Antikörper gegen GFP analysiert. Die Lysate wurden als Expressionkontrolle mit anti-GFP und anti-Cullin3 überprüft. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären anti-Maus (GFP) bzw. anti-Kaninchen (Cullin3) Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. RhoBTB Proteine können über die BTB1 Domäne mit Cullin3 eine Bindung eingehen.








3.7 Interaktion der RhoBTB Proteine mit weiteren Faktoren der Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexen

3.7.1 Ubiquitin konjugierende Enzyme (E2)

In Cullin-abhängigen Ubiquitin Komplexen sind neben Cullinen als Kern weitere Komponenten beteiligt. Ubiquitin konjugierende Enzyme (E2) sind Teil der Cullin Komplexe und die räumliche Annäherung von E2 und Substrat bewirkt die direkte Ubiquitin-Übertragung auf das Zielprotein. In einer von diesen Experimenten unabhängigen Durchmusterung einer Mausgehirn-Bibliothek nach Bindungspartnern wurde auch E2 (Accession # NP_075719, XP_110428) als möglicher Bindungspartner identifiziert. Nachdem die Interaktion von RhoBTB und Cullinen

bekannt geworden ist (Ergebnisse 3.6; Wilkins et al., 2004), wurde auch die Interaktion von E2 mit RhoBTB Proteinen interessant und mit Hilfe von Hefe Hybrid-Analysen untersucht. Es konnte eine direkte Interaktion mit E2 und dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB2 und RhoBTB3 gezeigt werden (Tab. 3.4). Die GTPase Domänen wiesen hingegen keine Interaktion durch Blaufärbungen auf. Eine Eingrenzung der Bindungsregion mit einzelnen Domänen von RhoBTB3 schlug wahrscheinlich aus bereits vorher genannten Gründen (Abschnitt 3.3) fehl.

Tabelle 3.4 RhoBTB Proteine interagieren mit Ubiquitin konjugierendem Enzym E2 .

pAS	pGADT7	E2
RhoBTB3-GTPase		-
RhoBTB3-B1B2C		++
RhoBTB3-B1		-
RhoBTB3-B2		-
RhoBTB3-C		-
RhoBTB2-GTPase		-
RhoBTB2-B1B2C		++

Verschiedene RhoBTB3 Domänen wurden in Hefevektoren kloniert. RhoBTB-GTPase enthält die GTPase Domäne, RhoBTB-B1B2C die BTB1, BTB2 und C-terminale Domäne, und RhoBTB3-B1, RhoBTB3-B2 und RhoBTB3-C die jeweils einzelnen Domänen. Das Hefe Hybrid-System zeigte Interaktion mit dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB. + bezeichnet die relative Intensität der Blaufärbung, - bezeichnet keine Blaufärbung.

Die Hefe Hybrid-Experimente zeigten, dass E2 und RhoBTB Proteine durch den C-terminalen Bereich (B1B2C) eine Bindung eingehen. Die Interaktion der Proteine konnten folgende Koimmunpräzipitationen bestätigen (Abb. 3.15). Um die Bindungsregion der RhoBTB Proteine *in vivo* mit Koimmunpräzipitation weiter einzuschränken, wurden auch hierbei verschiedene Konstrukte mit RhoBTB Domänen benutzt (vgl. 2.1.9.2). Die Interaktion mit E2 findet in Übereinstimmung mit den Hefeexperimenten nicht durch die GTPase Domäne statt, jedoch zeigen alle anderen Konstrukte mit der ersten bzw. zweiten BTB Domäne und dem C-Terminus alleine wie in Kombination eine Bindung, die allerdings mit einzelnen Domänen schwächer auftrat. Demzufolge ist der komplette C-terminale Bereich (B1B2C) zur

Interaktion befähigt oder in Säugetierzellen kommt es zu einer Komplexbildung. Möglicherweise sind hierfür auch die Dimerisierungen der RhoBTB Proteine und Cullin Bindungen erforderlich. Die Kontrollen sind negativ und es ist eine unspezifische Bande bei 45 kDa (leichte Antikörperkette) zu erkennen.

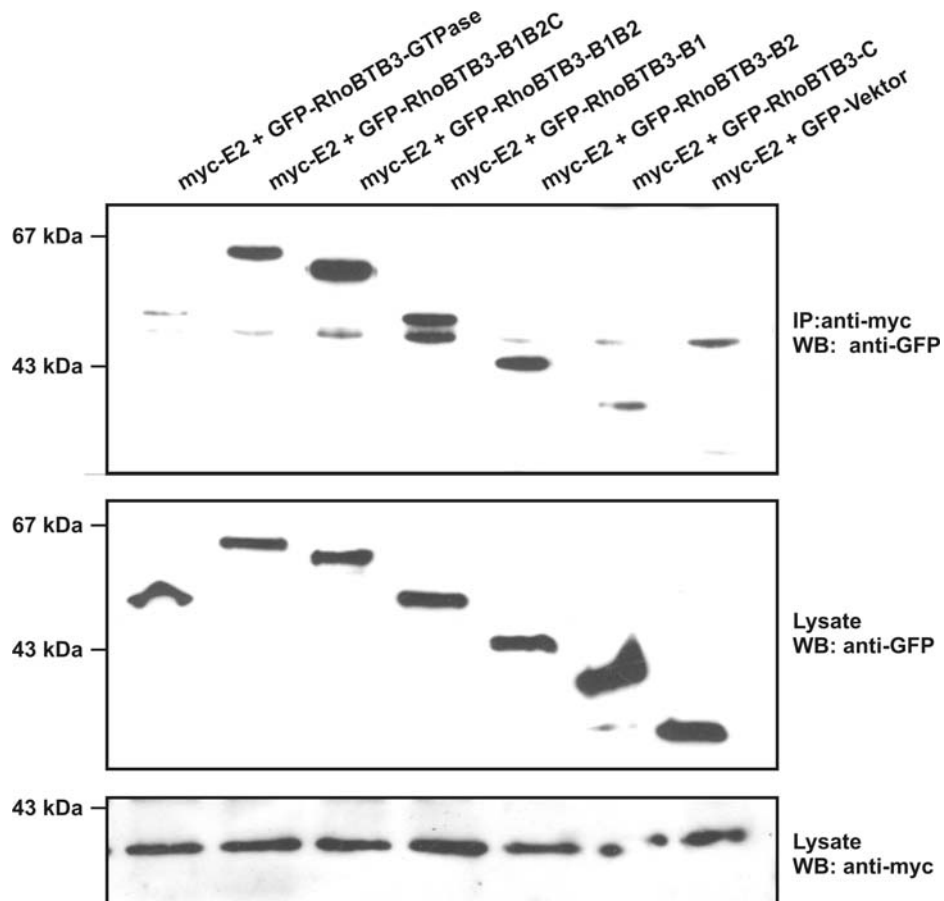


Abbildung 3.15 RhoBTB Proteine interagieren mit E2 *in vivo*. COS7-Zellen wurden mit verschiedenen RhoBTB Domänen als GFP-Fusionen und Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) als myc-Fusion transfiziert, mit anti-myc-Antikörper immunpräzipitiert und nach 12%-iger SDS-PAGE im Western-Blot mit Antikörper gegen GFP analysiert. Die Lysate wurden als Expressionskontrolle mit anti-GFP und anti-myc überprüft. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären anti-Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. RhoBTB Proteine können *in vivo* mit dem kompletten C-terminalen Bereich (B1B2C) und sogar mit jeder BTB Domäne eine Bindung eingehen. Die Interaktion mit der GTPase Domäne und dem C-Terminus erscheint sehr schwach.

3.7.2 Ring Box Proteine (Roc1)

Cullin-abhängige Ubiquitin Ligasen Komplexe beinhalten neben Ubiquitin-konjugierendem E2 weitere wichtige Komponenten wie den RING-Box Faktor HRT1/Rbx1/Roc1. Wie auch E2 wurde der RING-Box Faktor im Bezug auf RhoBTB Proteine näher untersucht. Bei Koimmunpräzipitationen *in vivo* konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des RING-Faktors die Bindung zwischen Cullinen und

RhoBTB Proteinen verstärkt (Abb. 3.16). Es wurde jeweils Cullin3 mit RhoBTB1, RhoBTB2 und RhoBTB3 mit und ohne Zugabe von Roc1 präzipitiert. Besonders bei der Immunpräzipitation von Cullin3 mit RhoBTB2 zeigt sich anhand der Western-Blot-Analyse deutlich mehr präzipitiertes Protein bei vorhergegangener Kotransfektion mit RING-Faktor Roc1. Es ist davon auszugehen, dass Roc1 einen stabilisierenden Effekt auf die Interaktion von Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligasen mit RhoBTB Proteinen bewirkt.

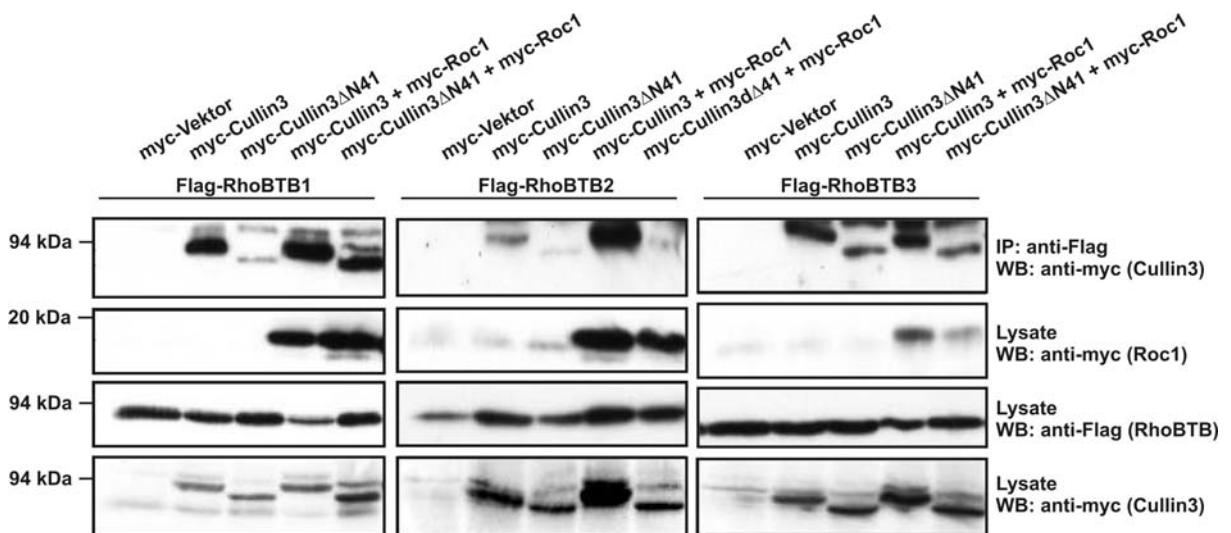


Abbildung 3.16 RING-Faktor stabilisiert RhoBTB Bindung mit Cullinen. COS7-Zellen wurden mit RhoBTB3 als Flag-Fusionsprotein, Cullin3 (vollständige Sequenz) bzw. Cullin3 Δ N41 (41 AS am N-Terminus deletiert) als myc-Fusionsproteine und Roc1 als myc-Fusionsprotein transfiziert. Culline wurden mit Flag-RhoBTB immunpräzipitiert und nach 12%-iger SDS-PAGE im Western-Blot mit anti-myc-Antikörper analysiert. Die Expression der Proteine wurde in den Lysaten mit anti-myc- und anti-Flag-Antikörpern getestet. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären anti-Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. Die Immunpräzipitation wurde von P. Aspenström durchgeführt und die Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Um eine direkte Bindung von RhoBTB und Roc zu untersuchen, wurde das Hefe Hybrid-System angewandt. Der RING-Box-Faktor wurde in Hefevektoren kloniert und mit vorhandenen Konstrukten von verschiedenen RhoBTB2 bzw. RhoBTB3 Domänen auf eine Interaktion getestet. Es konnte jedoch keine Bindung zwischen dem RING-Faktor und weder der GTPase Domäne noch dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB2 oder RhoBTB3 nachgewiesen werden. Die Bindung von HRT1/Rbx1/Roc1 ist möglicherweise nur auf Cullin beschränkt.

3.8 Expression der RhoBTB Proteine in Bakterienzellen

Weitere Aspekte der RhoBTB GTPasen sollten mit Hilfe von rekombinanten Proteinen erfolgen. Zum einen ist die Expression der GTPase Domäne erforderlich für Studien der GTPase-Aktivität. Es ist bisher nicht bekannt, ob RhoBTB Proteine GTP hydrolysieren können, besonders die RhoBTB3 Isoform, bei welcher die GTPase Domäne stark von anderen Rho Proteinen abweicht. Zum anderen ist die Kristallisation des RhoBTB3 Proteins von Interesse. Die Struktur der Isoform kann Einblicke in die Komplexbildung ermöglichen und essentielle Aminosäuren für die Dimerisierung und Ausbildung von Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligasekomplexen (Abschnitt 3.6 und 3.7) liefern, die spätere Mutationsanalysen erleichtern würden.

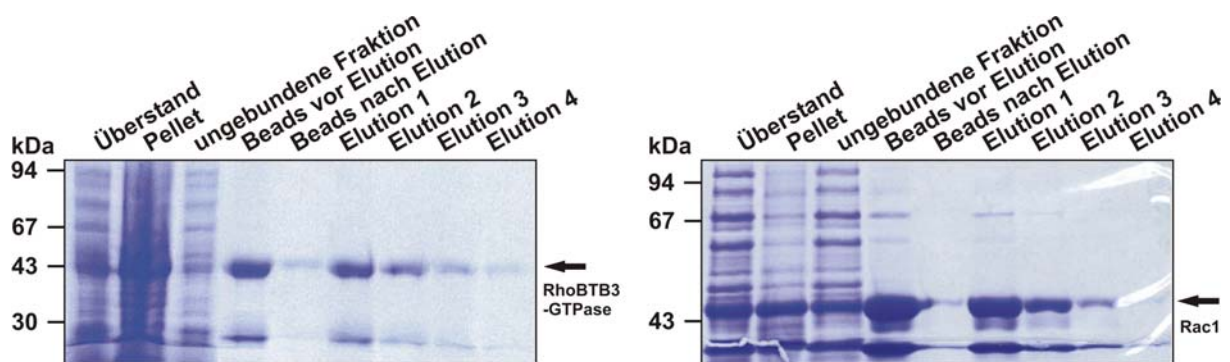


Abbildung 3.17 Aufreinigung von der GTPase Domäne von RhoBTB3 (links) und Rac1 (rechts). Coomassie-Färbung der verschiedenen Fraktionen der Proteinaufreinigung, die mit 12%- bzw. 15%-iger SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

Bisher konnte nur die GTPase Domäne von RhoBTB3 als GST-Fusionsprotein aufgereinigt werden (vgl. 2.1.9.3; Abb. 3.17, links). Die humane Rac1 Rho GTPase sollte als Kontrolle dienen und konnte leicht aufgearbeitet werden (Abb. 3.17, rechts). Die Aufreinigung der RhoBTB1 GTPase Domäne als GST-Fusions- als auch His-Fusionsprotein schlug bisher aufgrund der Unlöslichkeit des Proteins fehl (vgl. 2.1.9.3; nicht gezeigt). Expressionen von vollständigem RhoBTB3 Protein sowie Proteinen mit der GTPase Domäne und BTB-Tandem sowie GTPase Domäne und nur die erste BTB Domäne als GST-Fusionen in Bakterienzellen verliefen erfolgreich, aber darauf folgende Reinigungsschritte scheiterten erneut an der Unlöslichkeit der Proteine. Eine Aufarbeitung mit Harnstoff oder Sarkosyl kam für eine native Proteingewinnung nicht in Frage. Stattdessen wurde das Expressionssystem gewechselt. Das RhoBTB3 Protein, welches die vollständige Sequenz umfasst, wird nun in dem niederen Eukaryonten *Dictyostelium discoideum* exprimiert und mit

einem TAP-System (*tandem affinity purification*) gereinigt (Puig et al., 2001). Dieses System basiert auf einem TAP-Anhang und eignet sich sehr gut für die Aufarbeitung von Proteinkomplexen.

3.9 Subzelluläre Lokalisation der RhoBTB Proteine

Die subzelluläre Lokalisation der Proteine der RhoBTB Familie könnte für die Funktion und die Regulation entscheidend sein. Aus diesem Grund wurden sowohl die Lokalisation in Zellen als auch die molekularen Eigenschaften der Proteine für diese Lokalisation in dieser Arbeit untersucht. Es war davon auszugehen, dass der C-Terminus für die spezifische Lokalisation von RhoBTB Proteinen verantwortlich ist. Der C-Terminus der RhoBTB Proteine umfasst 80 Aminosäuren und das letzte Drittel der Domäne zeigt einen hohen Gehalt an geladenen Aminosäuren auf (Abb. 3.18). RhoBTB3 endet als einzige Isoform mit einem Prenylierungsmotiv, während RhoBTB1 und RhoBTB2 Erweiterungen variabler Länge aufweisen. Die C-terminalen Domänen besitzen vier α -Helices (H) und bei RhoBTB1 und RhoBTB2 eine Erweiterung durch ein β -Faltblatt (E).

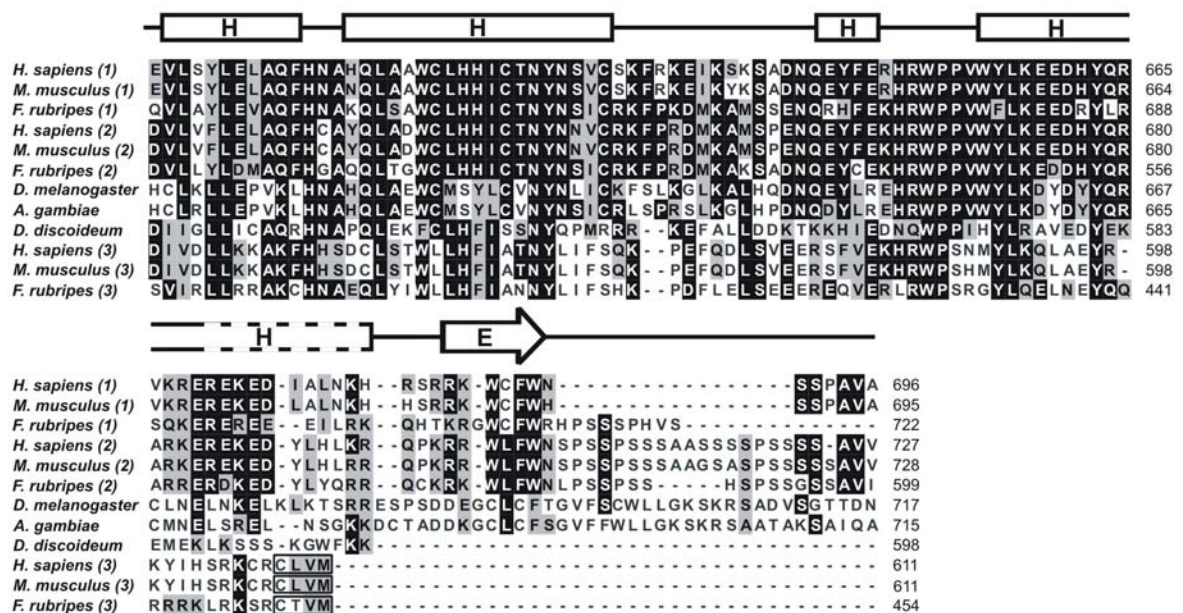


Abbildung 3.18 Sekundärstrukturen des Carboxyl-Terminus der RhoBTB Proteine. Identische oder ähnliche Aminosäuren in mindestens fünf Sequenzen sind schwarz oder grau hinterlegt. RhoBTB3 endet als einzige RhoBTB GTPase mit einem Prenylierungsmotiv am C-Terminus. Sekundärstrukturvorhersage zeigt α -Helices (H) als Rechtecke und β -Faltblätter (E) als Pfeile (Ramos et al., 2002).

3.9.1 Subzelluläre Lokalisation von RhoBTB1 und RhoBTB2

Die Proteine RhoBTB1 und RhoBTB2 zeigen eine Lokalisation an bisher unidentifizierten punktförmigen Strukturen um den Nukleus. Bisher konnten Lysosomen und Golgi Apparat ausgeschlossen werden (Aspenström et al., 2004). In dieser Arbeit sollte der für die Lokalisation verantwortliche Bereich identifiziert werden. Auf diese Weise werden mehr Einblicke auf die Effekte der GTPasen und möglichen Funktionen gewonnen. RhoBTB1 und RhoBTB2 Proteine weisen eine hohe Ähnlichkeit der Sequenzen im C-Terminus auf und es fehlen ihnen Prenylierungsmotive oder andere Domänen für eine Membranverankerung oder irgendeine andere Membranverankerungs-Sequenz. Sie besitzen eine Erweiterung, die ein β -Faltblatt enthält. Der C-Terminus ist wahrscheinlich bei allen drei Isoformen für die Lokalisation in der Zelle verantwortlich.

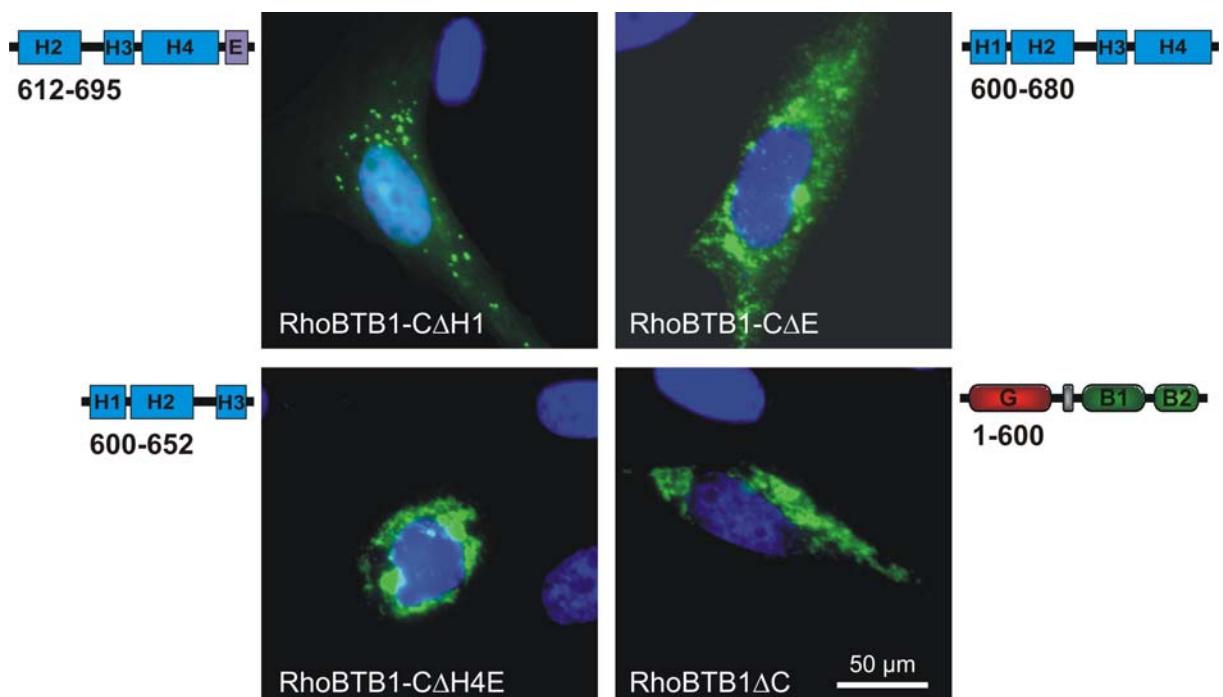


Abbildung 3.19 Lokalisierung von trunkeerten RhoBTB1 in PAE-Zellen. PAE (*porcine aortic endothelial*)-Zellen wurden mit RhoBTB Konstrukten als GFP-Fusionen transfiziert und nach einem Tag mit Paraformaldehyd fixiert und mit DAPI gefärbt (blau). Das Konstrukt RhoBTB1-C Δ H1 beinhaltet die C-terminale Domäne ohne die erste α -Helix, RhoBTB1-C Δ E die C-terminale Domäne ohne β -Faltblatt und RhoBTB1-C Δ H4E fehlen die letzte α -Helix und das β -Faltblatt. Bei RhoBTB1 Δ C ist die vollständige C-terminale Domäne deletiert. Die verwendeten Konstrukte sind schematisch mit Aminosäuren dargestellt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop aufgenommen.

Es wurden trunkeerte Versionen des C-Terminus von RhoBTB1 hergestellt, denen das β -Faltblatt, die letzte α -Helix und das β -Faltblatt bzw. die erste α -Helix des C-Terminus fehlten (vgl. 2.1.9.2). Es konnte jedoch keine Veränderung der Lokalisation

von den RhoBTB1 Konstrukten in PAE-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.19). Keine der trunkierten Versionen zeigte eine abweichende Verteilung im Vergleich zum vollständigen RhoBTB1 Protein. Dieser Befund war sehr überraschend und wurde mit einem weiteren Konstrukt überprüft, dem der vollständige C-Terminus fehlt. Auch hierbei zeigt sich mit transienter Expression in der Zelle die Aggregatbildung um den Zellkern (Abb. 3.19). Dies widerlegt die bisherige Vermutung, dass der C-Terminus die spezifische Lokalisation bewirkt. Somit ist bisher nicht klar, welcher Bereich von RhoBTB1 für die Lokalisation verantwortlich ist. Einen weiteren interessanten Aspekt bot eine Mutation von RhoBTB2, die in einer Brustkrebszelllinie gefunden wurde und sich in der C-terminalen Domäne befindet (Pro647Thr). Es bestand die Möglichkeit, dass diese Mutation einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins hat und wurde mittels PCR-basierenden Mutagenese eingefügt. Die Mutation zeigte jedoch keinen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation von RhoBTB2 (nicht gezeigt). Wie RhoBTB1 war das RhoBTB2 Protein um den Nukleus als punktartige Struktur verteilt.

3.9.2 Lokalisation von RhoBTB3

Die RhoBTB3 Isoform trägt als einzige RhoBTB GTPase ein Prenylierungsmotiv am C-Terminus, welches für Membranassoziationen - insbesondere zum Transport zum Golgi Apparat und ER - verantwortlich ist (vgl. 1.2.2). Die *in vivo* subzelluläre Lokalisation von RhoBTB3 wurde mit GFP-Fusionsproteinen mit verschiedenen Domänen des Proteins untersucht (vgl. 2.1.9.2). Die vollständigen Proteine sind in kleinen punktförmigen Strukturen um den Nukleus zu erkennen (Abb. 3.20). Die einzelnen BTB Domänen weisen eine diffuse Lokalisation auf. Neben dem vollständigen Protein zeigt nur die C-terminale Domäne eine ähnliche Verteilung um den Nukleus. Da nur diese beiden Konstrukte eine definierte Lokalisation aufwiesen, ruft der C-Terminus durch das Prenylierungsmotiv diese Verteilung hervorruft. Dasselbe Ergebnis wurde in HeLa-Zellen erreicht (nicht gezeigt).

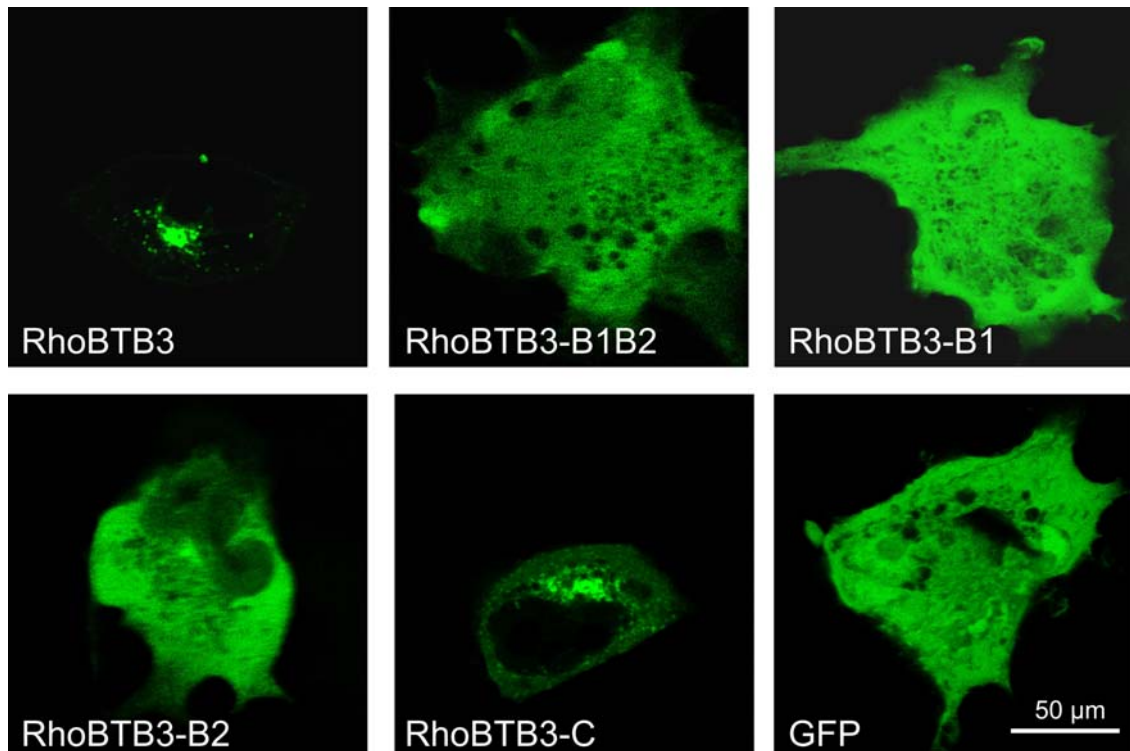


Abbildung 3.20 Lokalisation von RhoBTB3 in COS7-Zellen. COS7 Zellen wurden mit RhoBTB Konstrukten als GFP-Fusionen transfiziert und nach einem Tag mit Paraformaldehyd fixiert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop aufgenommen. Die C-terminale Domäne von RhoBTB enthält ein Prenylierungsmotiv, das für Membranverankerung vieler Proteine am Golgi Apparat verantwortlich ist.

Es stellte sich die Frage, an welchen Strukturen RhoBTB3 angelagert ist. Die Lokalisation von RhoBTB3 ist einer Golgi-Apparat-Färbung sehr ähnlich. Es ist zudem bekannt, dass Proteine mit Prenylierungsmotiven zum Golgi-Apparat transportiert werden. Daher wurden RhoBTB3-exprimierende Zellen mit verschiedenen Zellmarkern untersucht, speziell für den Golgi Apparat und das endoplasmatische Retikulum (ER). Als Marker für den Golgi-Apparat diente ein Mitglied der Golgin Familie (GM130) bzw. Mannosidase II und als Marker für das ER die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI). Es wurden verschiedene Zelltypen für diese Untersuchungen verwendet und unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Eine Transfektion mit RhoBTB3 als GFP-Fusionsproteine und anschließender Golgi-Apparat-Färbung in PAE-Zellen zeigt nur eine zufällige Überlappung der beiden Fluoreszenzsignale und somit keine Kolokalisierung von RhoBTB3 und Golgi (Abb. 3.21, A). Hingegen konnte in der Überlagerung von HeLa-Zellen eine Kolokalisation vom RhoBTB3 Protein mit dem Golgi-Apparat detektiert werden (Abb. 3.21, B). Allerdings sieht es aus, als würde das GFP-Protein die Golgi-Färbung unterbinden. Möglicherweise ist der Golgi-Apparat sogar durch das überexprimierte

RhoBTB3 Protein beeinflusst. In sehr seltenen Einzelfällen konnte eine Verschmelzung von dem Golgi-Apparat und dem ER (Brefeldin-Syndrom) auch anhand der RhoBTB3 Expression beobachtet werden (nicht gezeigt). Mit Hilfe von Lebendaufnahmen der transient exprimierenden PAE- und COS7-Zellen konnten jegliche dynamische Verhaltensweisen von RhoBTB3 ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

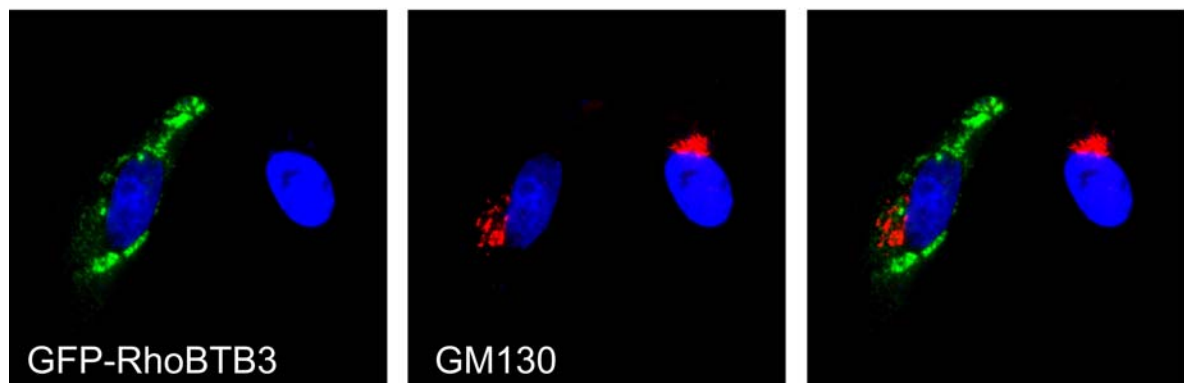
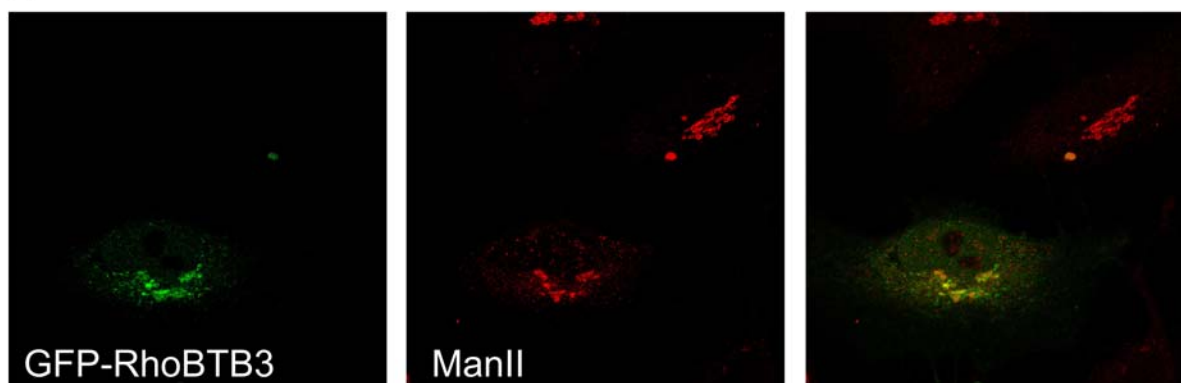
A**B**

Abbildung 3.21 RhoBTB3 Lokalisation zeigt nur teilweise Golgi-Apparat Assoziation. PAE-Zellen (**A**) und HeLa-Zellen (**B**) wurden mit RhoBTB Konstrukten als GFP-Fusionen transfiziert, nach einem Tag mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-GM130 oder anti-Mannosidase II als Golgi-Marker gefärbt (sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 568). (**A**) wurde zusätzlich mit DAPI gefärbt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen LaserScan Mikroskop aufgenommen.

Die Lokalisation von RhoBTB3 Proteinen wurde auch mit einem bereits erwähnten Marker für das ER überprüft. Die Überlagerung der Aufnahmen zeigt in Abbildung 3.22 nur eine zufällige Überlappung der beiden Fluoreszenzsignale und somit keine Kolo-kalisation von RhoBTB3 und ER. Die Experimente müssen mit weiteren Doppelfärbungen und Markern für z.B. frühe bzw. späte Endosomen und Peroxisomen fortgesetzt werden.

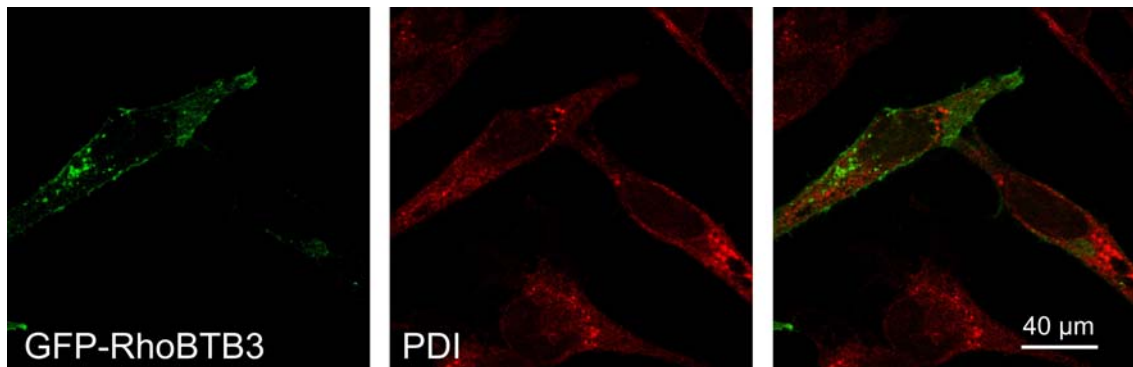


Abbildung 3.22 RhoBTB3 ist nicht mit dem ER kolokalisiert. COS7-Zellen wurden mit RhoBTB Konstrukten als GFP-Fusionen transfiziert, nach einem Tag mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) als ER-Marker gefärbt (sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 568). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop aufgenommen.

3.10 Rolle der RhoBTB Proteine in der Tumorentstehung

RHOBTB2 wurde als Tumorsuppressorgen postuliert, da sowohl die Protein- als auch die mRNA Expression in vielen Tumoren erniedrigt ist (Hamaguchi et al., 2002; Knowles et al., 2005). Jüngst wurde auch RHOBTB1 Expression mit Tumoren assoziiert (Beder et al., 2006). Es ist daher von großem Interesse, die Studien auf alle Mitglieder der RhoBTB Familie auszudehnen. Aufgrund der niedrigen Expression der RhoBTB Proteine im Gewebe (3.2) wurde zunächst die Expressionsanalyse von Krebsgewebe mit *cancer arrays* begonnen (2.2.12). Aufgrund der Aspekte der RhoBTB Proteine als Adaptoren in Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexen sollten auch die direkt (CUL3) und indirekt (CUL5) RhoBTB-bindenden Komponenten hinsichtlich ihrer Expressionsmuster in Tumorgeweben untersucht werden. Ein *cancer profiling array* (CPA) und ein *cancer cell line profiling array* (CCLPA) wurden mit radioaktiven Sonden für RHOBTB1, RHOBTB2, RHOBTB3 sowie CUL3 und CUL5 hybridisiert, um eine Veränderung der Expressionsmuster zwischen tumoralen Geweben im Vergleich zu normalen Geweben zu bestimmen. Um Kreuzreaktionen zu vermeiden wurden für RHOBTB1 und RHOBTB2 PCR-Fragmente amplifiziert, die die erste BTB Domäne kodieren und sich bei diesen Isoformen unterscheiden. Bei RHOBTB3 ist die GTPase Domäne stark abweichend und es wurde ein korrespondierendes PCR-Fragment in dieser Domäne benutzt. Für CUL3 und CUL5 wurden jeweils PCR-Fragmente mit vollständig kodierender Sequenz amplifiziert. Bei beiden Arrays konnte in den negativen Kontrollen keine Expression detektiert werden: Hefe-RNA, Hefe-tRNA, *E. coli* DNA, poly r(A), C₀t-1 DNA und genomische DNA (Abb. 3.23, Abb. 3.27).

3.10.1 Expressionsanalyse bei einem *cancer profiling array*

Auf dem CPA wurde RNA aus 13 Gewebetypen von Patienten parallel Tumorgewebe und gesundes Gewebe aufgetragen und immobilisiert. Die Membranen wurden nach Herstellerangaben hybridisiert (s. 2.2.13). Eine radioaktive Sonde für Ubiquitin zeigt die Integrität der immobilisierten Proben und diente zur Normalisierung der spezifischen Signale (Abb. 3.23). Der CPA wurde erneut mit radioaktiv markiertem RHOBTB1, RHOBTB2, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 hybridisiert. Aufgrund der geringen Expression von RHOBTB2 in Geweben in der Northern Blot-Analyse erzielte auch die Hybridisierung der RHOBTB2 Sonde keine signifikanten Signale. In den weiteren Analysen wurde RHOBTB2 daher nicht weiter berücksichtigt. Für die anderen Gene wurden durch Quantifizierung der Autoradiogramme aus Abb. 3.23 mit Hilfe eines Phosphorimagers und der ImageQuant Software Signalstärken abgeleitet. Für jede Probe wurde ein Hintergrundausgleich vorgenommen und die Werte mit den korrespondierenden Ubiquitin Proben normalisiert. In einigen Geweben zeigte der CPA eine Erniedrigung der Expression von RHOBTB und CUL im Vergleich zu normalem Gewebe (Abb. 3.24). Für die Mittelwerte von RHOBTB1 war diese erniedrigte Expression statistisch signifikant in der Niere ($\sim 1,9$ -fach, $P = 3,4 \times 10^{-7}$, $n = 20$), in der Brust ($\sim 1,4$ -fach, $P = 1,3 \times 10^{-6}$, $n = 50$) und im Magen ($\sim 1,5$ -fach, $P = 0,013$, $n = 27$). Weitere Gewebe wie die Prostata, der Dünndarm und die Ovarien folgten diesem Trend, jedoch war die Reduzierung nicht signifikant. Die übrigen Gewebe zeigten nur geringe Veränderungen. Die Expression von RHOBTB3 war signifikant erniedrigt in der Niere ($\sim 2,5$ -fach, $P = 5,8 \times 10^{-5}$, $n = 20$), in der Brust ($\sim 1,7$ -fach, $P = 2,5 \times 10^{-7}$, $n = 50$) und im Uterus ($\sim 1,4$ -fach, $P = 2,5 \times 10^{-6}$, $n = 42$), gefolgt von der Lunge ($\sim 1,5$ -fach, $P = 0,003$, $n = 21$) und den Ovarien ($\sim 1,9$ -fach, $P = 0,012$, $n = 14$). CUL3 war signifikant niedriger exprimiert in der Brust ($\sim 1,5$ -fach, $P = 4,7 \times 10^{-7}$, $n = 50$) und in der Niere ($\sim 1,5$ -fach, $P = 6,5 \times 10^{-6}$, $n = 20$). In ähnlicher Form zeigte auch CUL5 statistisch signifikante Expressionserniedrigung in der Brust ($1,6$ -fach, $P = 2,6 \times 10^{-7}$, $n = 50$) und der Niere ($1,5$ -fach, $P = 0,0002$, $n = 20$), ferner in Ovarien ($1,4$ -fach, $P = 0,0361$, $n = 14$) und Rektum ($1,3$ -fach, $P = 0,0217$, $n = 18$). Übereinstimmend ist für alle vier Gene die geringe Expression in Brust- und Nierentumoren im Vergleich zu normalen Gewebeproben.

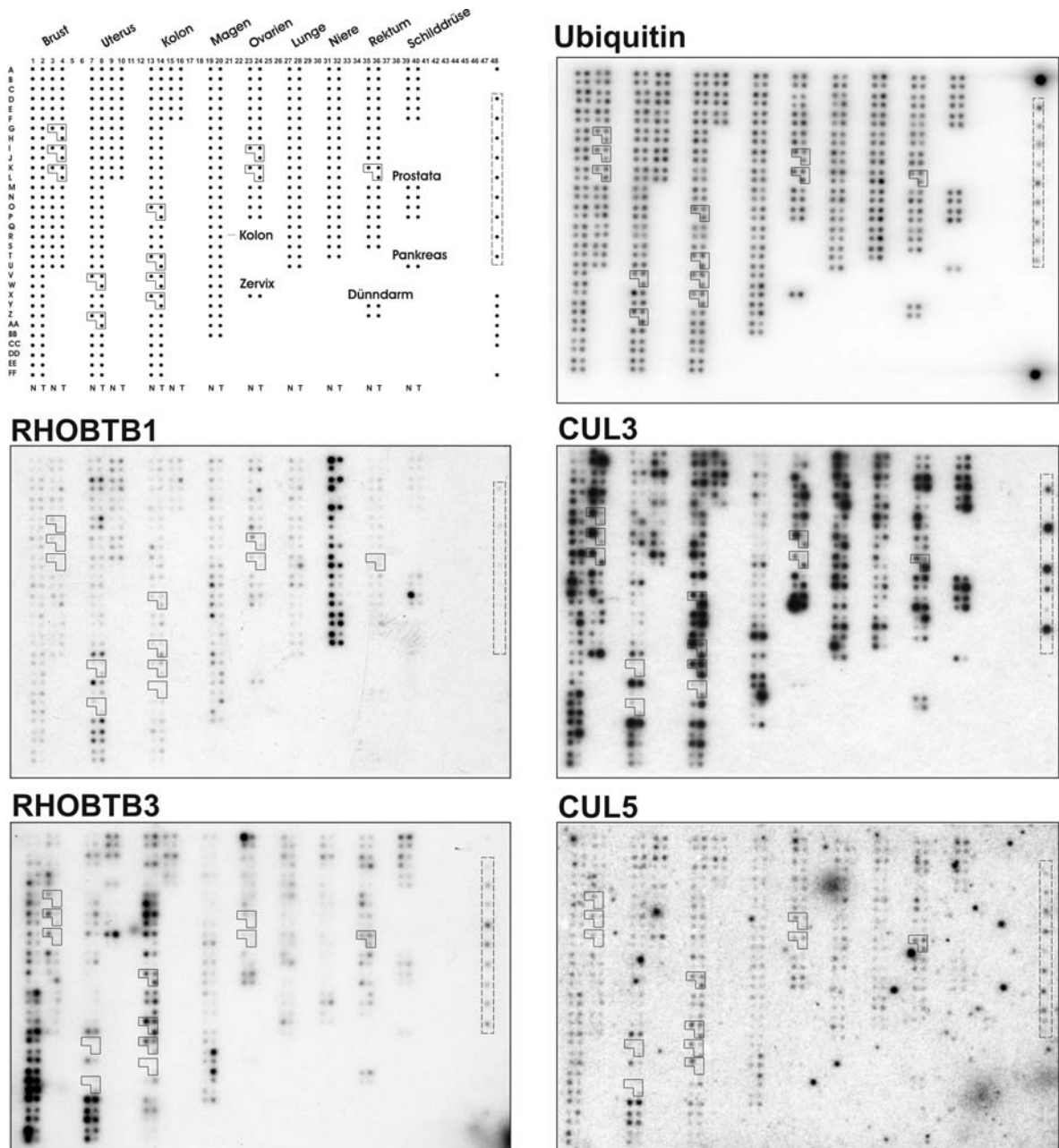


Abbildung 3.23 Expression von RHOBTB1, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 in tumoralem gegenüber normalem Gewebe in einem *cancer profiling array*. N = normales Gewebe; T = tumorales Gewebe. Der CPA wurde mit entsprechenden ^{32}P -markierten Sonden hybridisiert und mit einer Ubiquitin-Sequenz die immobilisierte RNA verifiziert. Die Exposition erfolgte mit einer Phosphorimagerplatte für 48 Std. Die Kästchen markieren gepaarte Normal-/Tumorproben mit einer assoziierten Metastasenprobe. Die Proben im Bereich 28D bis 48T (gestrichelte Box) stammen von verschiedenen Tumorzelllinien: HeLa; Burkitt's Lymphom, DAUDI; chronische Leukämie K562; promyelozytische Leukämie HL-60; Melanom G361; Lungenkarzinom A549; lymphatische Leukämie MOLT-4; kolorektales Adenokarzinom SW480; Burkitt's Lymphom, Raji. Hybridisierungskontrollen repräsentieren die Bereiche 48X bis 48CC: Hefe-RNA; Hefe-tRNA; E. coli cDNA; poly r(A); humane C₀t-1 DNA; genomische DNA. In dem Bereich 48A und 48FF wurden Ubiquitin Proben (50 ng/Spot) aufgetragen. Informationen bezüglich der Patientenproben sind im Internet verfügbar unter <http://bioinfo.clontech.com/dparray>.

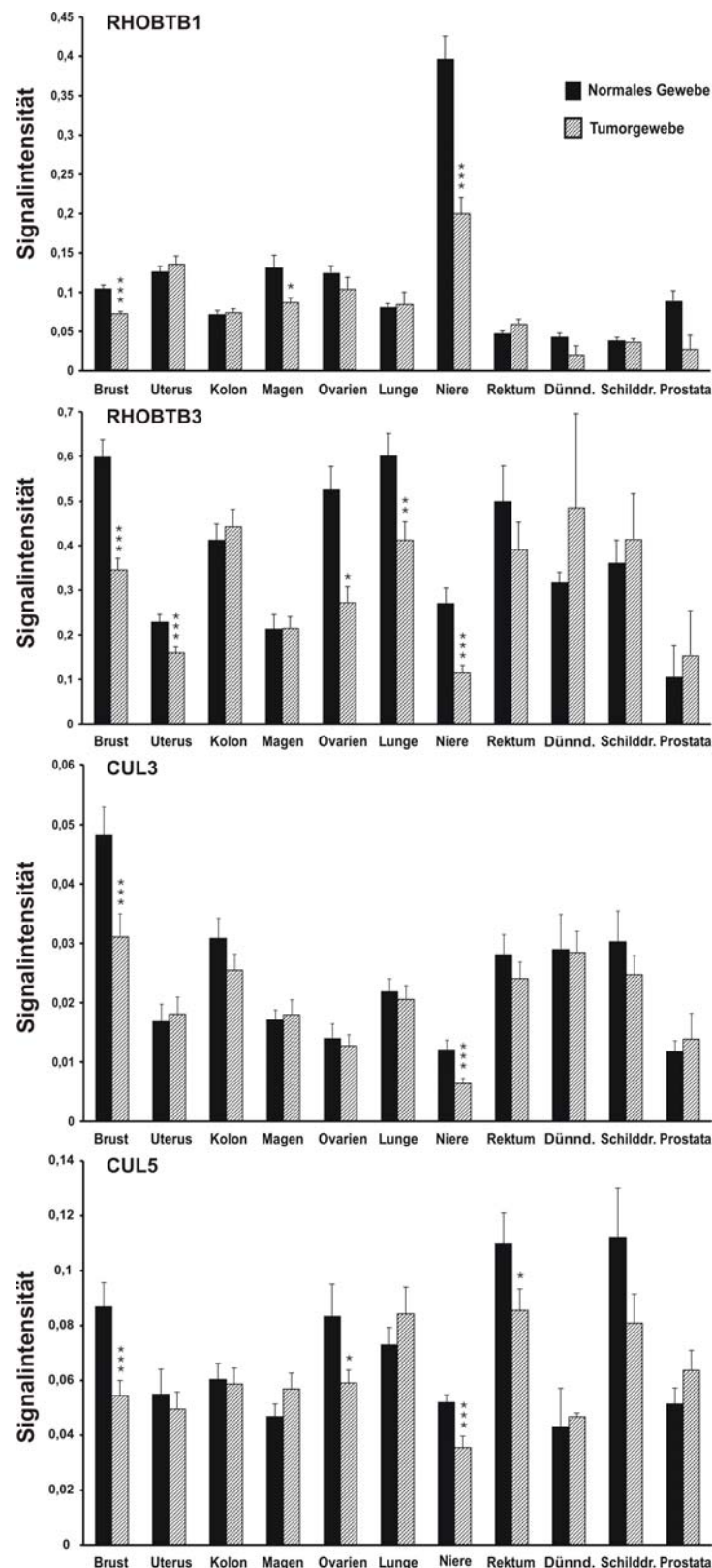


Abbildung 3.24 Expression von RHOBTB1, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe. Die Daten wurden durch Quantifizierung der Membranen aus Abb. 3.23 mit Hilfe eines Phosphorimagers und ImageQuant Software abgeleitet. Mit jeder Probe wurde ein Hintergrundausgleich vorgenommen und die Werte mit den korrespondierenden Ubiquitin Proben normalisiert. Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standard error of the mean*) sind dargestellt. Sterne markieren statistische Signifikanzunterschiede mit Students t-Test ermittelt (** $P < 0,001$; * $P < 0,01$; * $P < 0,05$). Proben von Zervix und Pankreas mit nur einem repräsentierten Gewebepaar wurden ausgelassen.

In den 50 analysierten humanen Brustproben demonstrierte RHOBTB1 in 37 Fällen (74%), RHOBTB3 in 41 Fällen (82%), CUL3 in 40 Fällen (80%) und CUL5 in 41 Fällen (82%) eine Abnahme der Expression in den verglichenen Proben. In den 20 analysierten Nierenproben zeigte RHOBTB1 in 20 Fällen (100%), RHOBTB3 in 18 Fällen (90%), CUL3 in 20 Fällen (100%) und CUL5 in 16 Fällen (80%) eine Erniedrigung der Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe. In den Metastasen beinhaltenden Proben der Brust, dem Kolon, den Ovarien und dem Rektum gab es bei allen vier Genen keine Abweichung von der korrespondierenden Tumorprobe. Allerdings zeigten RHOBTB1 und RHOBTB3 entgegengesetzte Expressionsmuster in zwei metastasierenden Uterusproben.

Der CPA beinhaltet auch einige Tumorzelllinien, einige davon exprimieren RHOBTB1 nur sehr gering. Die Expressionslevel von RHOBTB3 waren in K562 (chronische Leukämie), G361 (Melanom) und SW480 (Kolon-Adenokarzinom) erhöht. Hingegen zeigten die Gene von CUL3 und CUL5 eine erhöhte Expression in Burkitt's Lymphom, HL-60 und MOLT4 (Leukämie) und A549 (Lungenkarzinom).

3.10.2 Korrelationsanalysen von RHOBTB und CUL in einem CPA

Die simultane Änderung der Expression in Tumor- und Normalgewebe von RHOBTB1, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 veranlasste eine detaillierte Korrelationsanalyse der Expressionslevel der vier Gene (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5 Korrelationsanalyse der Änderung der Expressionslevel von RHOBTB und CUL3.

Gewebe	n	RHOBTB3 vs. CUL3		RHOBTB1 vs. CUL3		RHOBTB1 vs. RHOBTB3	
		r	t-Test	r	t-Test	r	t-Test
Brust	50	0,6235	***	0,4507	***	0,1215	
Uterus	42	0,5486	***	0,5691	***	0,3804	*
Kolon	35	0,0924		-0,0752		0,5785	***
Magen	27	0,1258		0,7467	***	0,0530	
Ovarien	14	0,0857		-0,3249		0,3472	
Lunge	21	0,4982	*	0,4157		0,1869	
Niere	20	0,0507		-0,0271		-0,1906	
Rektum	18	0,4936	*	0,1325		0,2267	
gesamt	237	0,3390	***	0,1526	**	0,2892	***

r = Korrelationskoeffizient. Sterne markieren statistische Signifikanzunterschiede, die mit Hilfe des Students t-Test ermittelt wurden (*** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05). Gewebe mit sechs oder weniger Proben wurden ausgelassen.

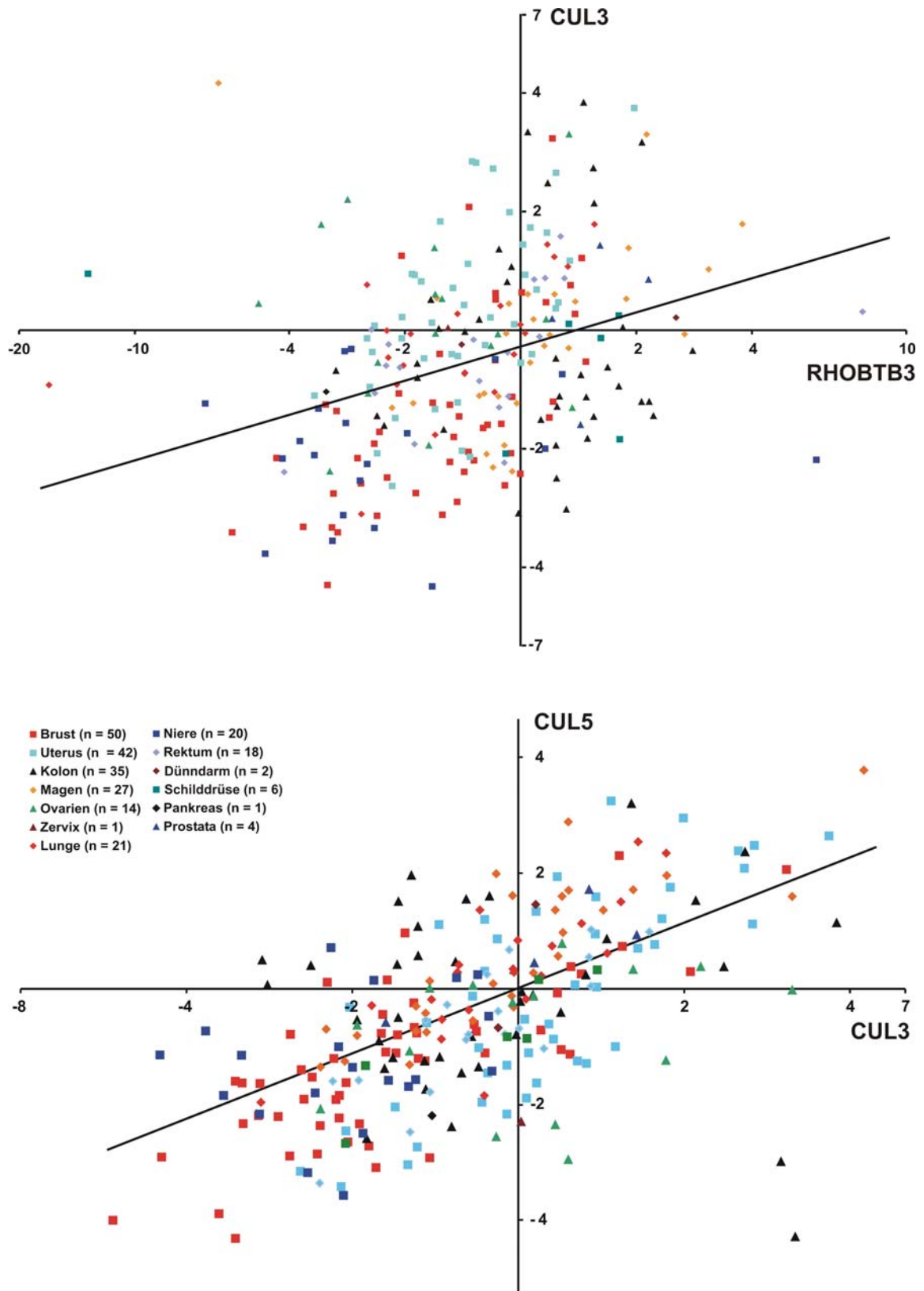


Abbildung 3.25 Korrelation der Änderung der Expressionslevel von RHOBTB3 versus CUL3 und CUL3 versus CUL5 in Tumorgewebe. Für jede Probe wurde die x-fache Veränderung von RHOBTB3 versus CUL3 und CUL3 versus CUL5 zwischen normalem Gewebe und Tumorgewebe durch Quantifizierung der Membranen aus Abb. 3.23 ermittelt. Die Regressionsgerade von allen Geweben für RHOBTB3 vs. CUL3 lautet $y = 0,29x - 0,04$ ($r = 0,339$, $n = 237$; $P = 8,72 \times 10^{-8}$) und für CUL3 vs. CUL5 lautet $y = 0,57x - 0,02$ ($r = 0,6137$, $n = 237$; $P = 4,45 \times 10^{-26}$). Proben einer Gewebegruppe sind mit Farben unterlegt und die Anzahl jeder Population ist angegeben.

Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen RHOBTB3 und CUL3 ($r = 0,339$, $P = 8,7 \times 10^{-7}$; Abb. 3.25) und zwischen RHOBTB1 und RHOBTB3 ($r = 0,2892$, $P = 6,7 \times 10^{-6}$; Anhang Abb. A1) festgestellt werden. Eine weit geringere Korrelation besteht zwischen RHOBTB1 und CUL3 ($r = 0,1526$, $P = 0,0187$; Anhang Abb. A1). In einzelnen Geweben wie z.B. in der Brust und im Uterus bestehen zwischen RHOBTB3 und CUL3 hohe Korrelationen, gefolgt von mittleren Korrelationswerten in der Lunge und im Rektum. RHOBTB1 korreliert mit CUL3 in der Brust, im Uterus und im Magen. Für RHOBTB1 und RHOBTB3 besteht eine hohe Korrelation im Kolongewebe. Aufgrund der zusätzlich simultanen Expressionerniedrigung von CUL5 mit RHOBTB Genen und CUL3 in einigen Geweben wurden die Korrelationsanalysen fortgesetzt (Tab. 3.6). Signifikante Korrelation ist zwischen RHOBTB3 und CUL5 ($r = 0,3938$, $P = 0,0019$) und in schwächerer Form zwischen RHOBTB1 und CUL5 ($r = 0,1997$, $P = 4,19 \times 10^{-10}$) festzustellen (Anhang Abb. A2). Die höchste Korrelation erbringt CUL3 vs. CUL5 ($0,6137$, $P = 4,45 \times 10^{-26}$; Abb. 3.25).

Tabelle 3.6 Korrelationsanalyse der Änderung der Expressionslevel von RHOBTB und CUL5.

Gewebe	n	RHOBTB3 vs. CUL5		RHOBTB1 vs. CUL5		CUL3 vs. CUL5	
		r	t-Test	r	t-Test	r	t-Test
Brust	50	0,4654	***	0,4826	***	0,7589	***
Uterus	42	0,4752	**	0,3115	*	0,7443	***
Kolon	35	0,2972		0,3114		0,0336	
Magen	27	0,1794		0,6588	***	0,8438	***
Ovarien	14	0,2127		-0,2941		0,2538	
Lunge	21	0,4143		0,5419	*	0,7991	***
Niere	20	0,1826		-0,3395		0,2519	
Rektum	18	0,3938		-0,0427		0,8239	***
gesamt	237	0,3901	***	0,1997	**	0,6137	***

r = Korrelationskoeffizient. Sterne markieren statistische Signifikanzunterschiede, die mit Hilfe des Students t-Test ermittelt wurden (***) $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$). Gewebe mit sechs oder weniger Proben wurden ausgelassen.

Die Betrachtung der einzelnen Gewebe zeigt hohe signifikante Wechselbeziehungen zwischen CUL3 und CUL5 in Brust, Uterus, Magen, Lunge und Rektum. Zwischen RHOBTB3 und CUL5 bestehen Korrelationen in der Brust und im Uterus und zwischen RHOBTB1 und CUL5 in Brust und Magen, gefolgt von Uterus und Lunge.

3.10.3 Semi-quantitative Analyse der Genexpression in Tumorzelllinien

der Haut

In dem *cancer profiling array* waren keine Hauttumore enthalten, daher wurde eine separate Analyse durchgeführt. RNA von normalen Hautproben, Melanomzellen und transformierten Keratinozyten wurde extrahiert und mit RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Hiernach erfolgte eine semi-quantitative PCR-Analyse mit spezifischen Oligonukleotiden, die in Amplifikationen von ungefähr 160 bp resultierten. Zur Normalisierung wurde die simultane Amplifikation von einem ubiquitären Gen, GAPDH (436 bp), verwendet.

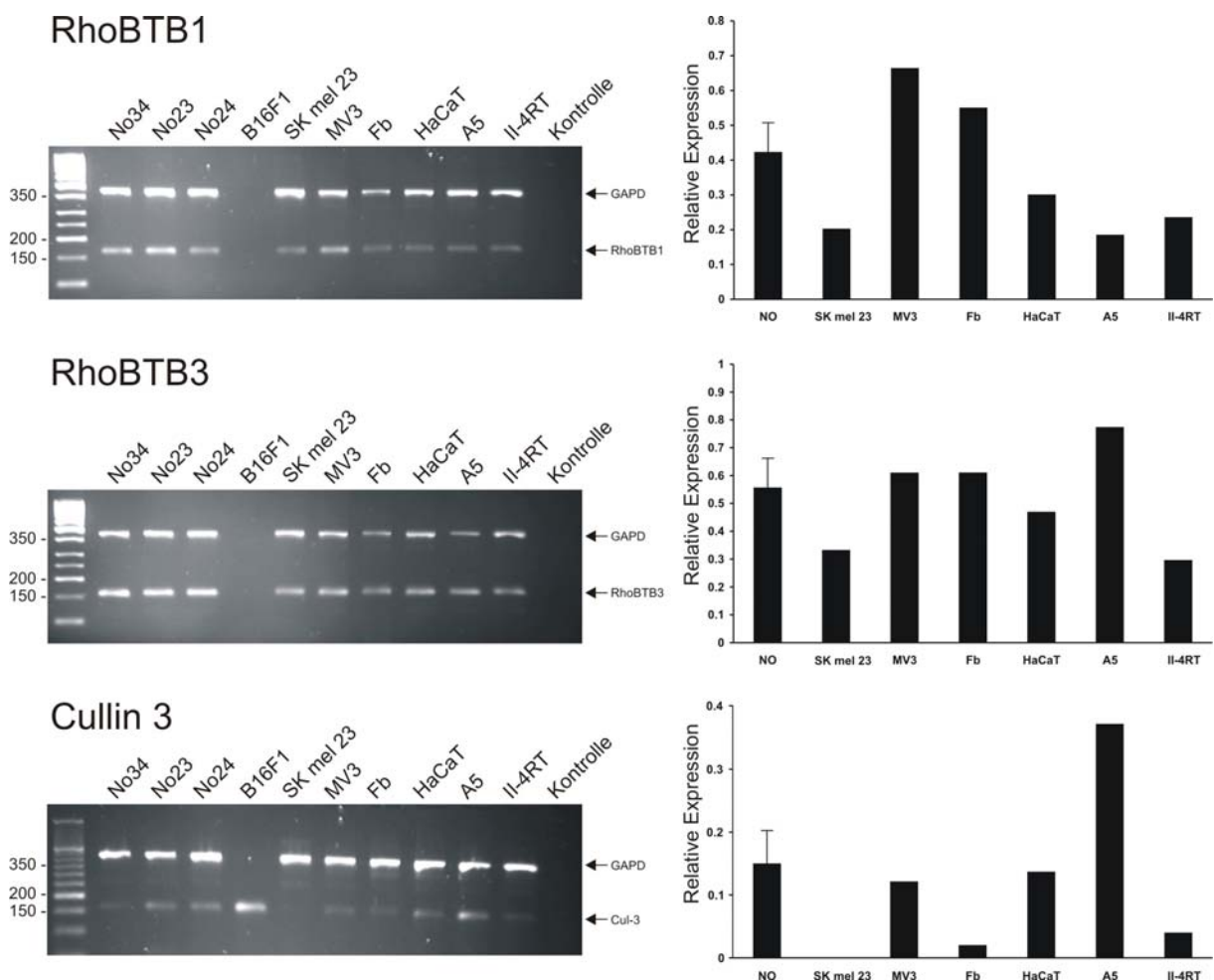


Abbildung 3.26 Expression von RHOBTB1, RHOBTB3 und CULLIN3 in normalem Hautgewebe im Vergleich zu verschiedenen Tumorzelllinien. RT-PCR und semi-quantitative PCR wurden mit spezifischen Primern für RHOBTB1 (165 bp), RHOBTB3 (159 bp) und CUL3 (160 bp) durchgeführt. Zur Normalisierung diente Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase (GAPDH, 436 bp). Es wurde normales Hautgewebe (NO), Fibroblasten der Haut (Fb), transformierte humane Zelllinien, gering (SK mel 23) und hoch (MV3) invasive Melanomzellen sowie nicht kanzerogenen (HaCaT), kanzerogenen benignen (A5) und malignen (II-4RT) Keratinozyten benutzt. B16F1, eine Melanomzelllinie der Maus, diente zur Kontrolle der Primerspezifität. Relative Expression wurde durch Quantifizierung der PCR-Produkte mit ImageQuant Software ermittelt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei normalen Hautproben sind gezeigt. Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente.

Die Melanomzelllinie MV3 ist bekannt für hohe Metastasierungsraten mit früher und häufiger Metastasenbildung nach subkutaner Inokulation in nackte Mäuse (Van Muijen et al., 1991), während die SK mel 23 Melanomzellen geringe invasive Eigenschaften tragen (Carey et al., 1976). Als Keratinozyten wurden Zelllinien mit unterschiedlichem biologischen Verhalten gewählt: HaCaT (nicht kanzerogen), A5 (kanzerogen, benigne) und II-4RT (kanzerogen, maligne). Wie in Abbildung 3.26 gezeigt, werden die Gene von RHOBTB1, RHOBTB3 und CUL3 in normalen Hautproben von Patienten, humanen Fibroblasten (Fb) und in allen analysierten Tumorzelllinien exprimiert. Die Expression von allen drei Genen war niedriger in gering invasiven Melanomzellen im Vergleich zu normalem Hautgewebe. Desweiteren zeigte RHOBTB1 erhöhte Expression in sehr invasiven Melanomzellen (1,6-fach). Die Expression von RHOBTB3 und CUL3 war in den benignen Keratinozyten höher (jeweils 1,4-fach und 2,5-fach), während in den malignen Keratinozyten entgegengesetztes Verhalten detektiert werden konnte. In diesen Zelllinien war die Expression von RHOBTB1 erniedrigt.

3.10.4 Expressionsanalyse bei einem *cancer cell line profiling array*

Auf dem CCLPA wurde RNA aus verschiedenen Tumorzelllinien immobilisiert, die mit diversen chemotherapeutischen Mitteln, oxidativen Stressinduktoren und Strahlung behandelt wurden (Tab. 3.7). Die entsprechenden Dosierungen der Behandlung resultieren nach 48 Std in einer 50%-igen Wachstumsreduktion (IC_{50}). Die Membranen wurden nach Herstellerangaben hybridisiert (s. 2.2.13). Eine radioaktive Sonde für Ubiquitin zeigt die Integrität der immobilisierten Proben und diente zur Normalisierung der spezifischen Signale (Abb. 3.27). Auch die Hybridisierung des CCLPA mit der RHOBTB2 Sonde lieferte keine signifikanten Signale, so dass RHOBTB2 in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt wurde. Die Expressionsanalyse von RHOBTB und CUL3 in behandelten Tumorzelllinien zeigt heterogene Expressionslevel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies trifft insbesondere für RHOBTB3 in speziellen Tumortypen, z.B. Lungenkarzinomen A549 und NCI-H1299 (Reihe 1 und 3) oder renalen Adenokarzinomen 786-O und ACHN (Reihe 21 und 22) zu.

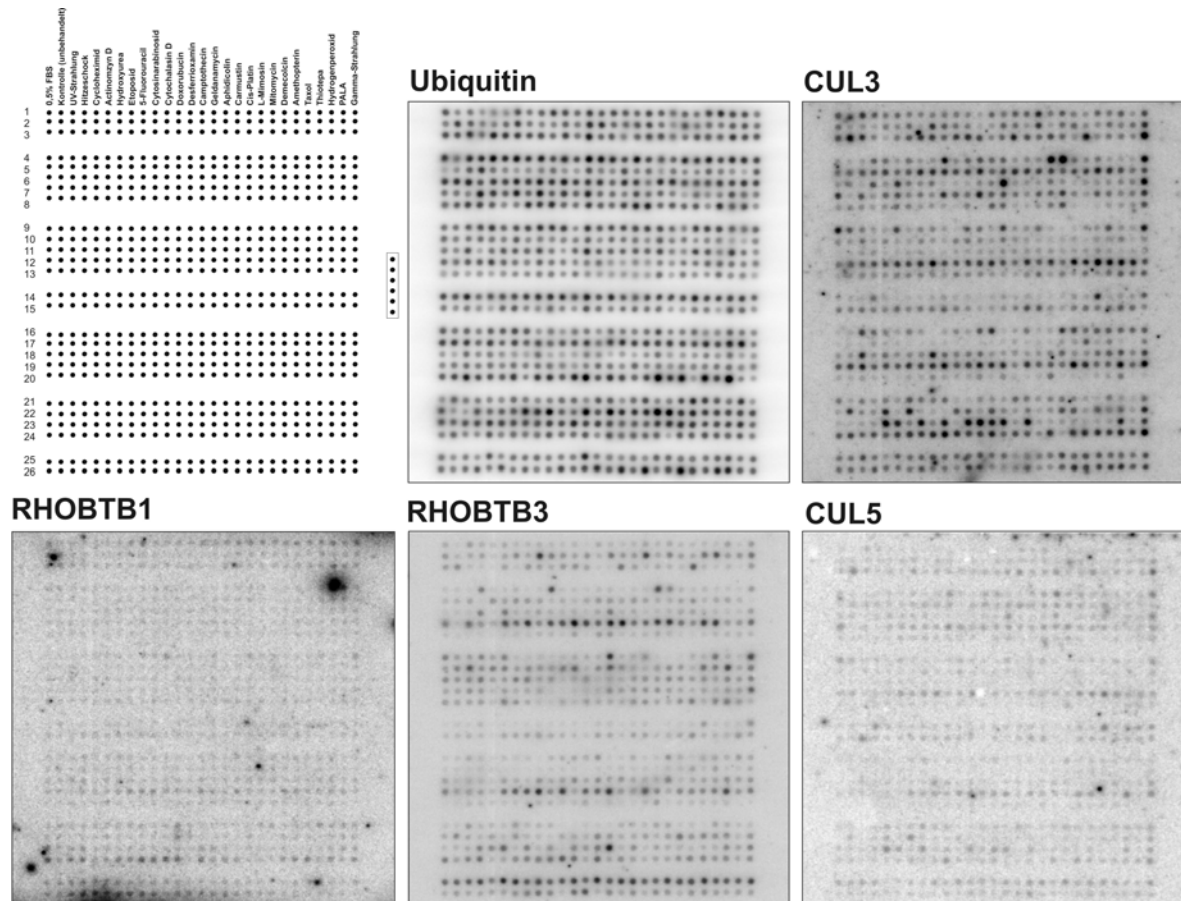


Abbildung 3.27 Expression von RHOBTB1, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 in Tumorzelllinien in einem *cancer cell line profiling array*. Der CCLPA wurde mit entsprechenden ^{32}P -markierten Sonden hybridisiert. 26 verschiedene humane Tumorzelllinien wurden mit chemotherapeutischen Agenzien, Stressinduktoren oder Strahlung behandelt, wobei die entsprechenden Dosierungen der Behandlung nach 48 Std in einer 50%-igen Wachstumsreduktion resultieren. Das Auftragungsmuster ist gezeigt (oben links). Die Hybridisierung mit einer Ubiquitin-Sequenz bestätigt die immobilisierten Gewebeprobe. Hybridisierungskontrollen sind im Kästchen repräsentiert (von oben nach unten): Hefe-RNA; Hefe-tRNA; E. coli cDNA; poly r(A); humane $\text{C}_0\text{t-1}$ DNA; genomische DNA. Verwendete Zelllinien: 1, Lungenkarzinom (A549); 2, großes Lungenzellkarzinom (NCI-460); 3, Lungenkarzinom (NCI-H1299); 4, Kolonkarzinom (HCT116); 5, Kolonkarzinom (HCT116 p21-/-); 6, Kolonkarzinom (HCT116 p53-/-); 7, Kolon-Adenokarzinom (HCT-15); 8, Kolon-Adenokarzinom (HT-29); 9, duktales Brustkarzinom (MDA-MB-435S); 12, Ovar-Adenokarzinom (SK-OV-3); 13, Zervixtumor (HeLa); 14, Prostata-Tumor (DU 145); 15, Prostata-Adenokarzinom (PC-3); 16, bösartiges Hautmelanom (SK-MEL-28); 17, bösartiges Hautmelanom (SK-MEL-5); 18, Gehirn-Neuroblastom (SK-N-SH); 19, Gehirn-Neuroblastom (IMR-32); 20, Gehirn-Glioblastom (U-87 MG); 21, renales Adenokarzinom (786-O); 22, renales Adenokarzinom (ACHN); 23, hepatozelluläres Karzinom (Hep G2); 24, Kolon-Adenokarzinom (COLO 587); 25, Knochensarkom (U-2 OS) und 26, Epidermoidkarzinom (A431). Informationen bezüglich der Behandlungen sind in Tab.3.7 zu finden und im Internet verfügbar unter <http://bioinfo.clontech.com/dparray>.

Um Effekte der verschiedenen Behandlungen der Zelllinien zu unterscheiden, wurden Veränderungen der Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet (Abb 3.28). Die Expression aller Gene der in 0,5% FBS inkubierten Zellen war im Durchschnitt vergleichbar mit unbehandelten Zellen (10% FBS), so dass Expressionswechsel in anderen Proben ausschließlich auf die spezielle Behandlung zurückzuführen sind.

Tabelle 3.7 Wirkungsmechanismen der verschiedenen Behandlungen der Gewebe im CCLPA.

Behandlung	Wirkungsmechanismus	Spalte
0,5% FCS	Wachstumsfaktor-Mangel	11
Kontrolle	unbehandelt	12
UV-Strahlung	DNA-Schädigung	13
Hitzeschock 44°C	Hitzeschock	14
Cycloheximid	Proteinsynthese-Inhibitor	15
Actinomycin D	DNA-bindend, Transkriptions-Inhibitor	16
Hydroxyurea	Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitor	17
Etoposid	Topoisomerase 2-Inhibitor	18
5-Fluorouracil	DNA-Synthese-Inhibitor	19
Cytosinarabinosid	DNA-Synthese-Inhibitor	20
Cytochalasin D	Aktin-aktives Mittel, depolymerisiert Aktinfilamente	21
Doxorubicin	Topoisomerase 2-Inhibitor	22
Desferrioxamin	Hypoxie	23
Camptothecin	Topoisomerase 1-Inhibitor	24
Geldanamycin	Hsp90-Inhibitor	25
Aphidicolin	DNA-Synthese-Inhibitor	26
Carmustin	Acetyliert O-6-Position von Guanin	27
Cis-Platin	Acetyliert N-7-Position von Guanin	28
L-Mimosin	Wachstums-Stopp, Zellzyklus-Blockade zu Beginn der S-Phase	29
Mitomycin	Acetyliert N-2-Position von Guanin	30
Demecolcin	Tubulin-aktives Mittel, Zytostatikum	31
Amethopterin	Folsäure-Metabolismus-Inhibitor	32
Taxol	Tubulin-aktives Mittel, Zytostatikum	33
Thiotepa	Acetyliert N-7-Position von Guanin	34
Hydrogenperoxid	Oxidativer Stress	35
PALA	RNA-Synthese-Inhibitor	36
Gamma-Strahlung	DNA-Schädigung	37

Die meisten Behandlungen induzieren mäßige Hochregulation (selten über 2-fachen Anstieg) von RHOBTB und CUL3 von den analysierten Genen. Statistisch signifikante Unterschiede (ANOVA) der Expressionslevel war für RHOBTB3 nach Behandlung mit Geldanamycin (~2,1-fach) und Mitomycin (~1,8-fach; zusammen mit CUL3, ~2,4-fach) messbar, danach folgten Etoposid, 5-Fluorouracil, Cytosinarabinosid, Doxorubicin und Camptothecin (~1,6-fach). Für RHOBTB1 erbrachte die Behandlung mit Thiotepa (~2,2-fach) signifikante Unterschiede. Einige Behandlungen wie Geldanamycin, Mitomycin und Gammastrahlen verursachten eine simultane Expressionserhöhung von allen Genen. Gamma-Strahlung induzierte als einzige Behandlung hohe und signifikante Hochregulation von allen vier Genen (jeweils ~3,0-fach, ~2,2-fach, ~3,4-fach und ~4,9-fach). Die Veränderungen der Expressionslevel von CUL5 aufgrund der verschiedenen Behandlungen waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zwischen den Zelllinien sehr inhomogen. Einige Behandlungen verursachten starke Expressionserhöhungen, z.B. durch Actinomycin D, Geldanamycin und Gammastrahlen (über 300% Anstieg). Die Expressionsunterschiede von CUL5 sind nach Behandlung mit Camptothecin (~3,2-fach), PALA (~1,6-fach) und Gamma-Strahlung (~4,9-fach) statistisch signifikant.

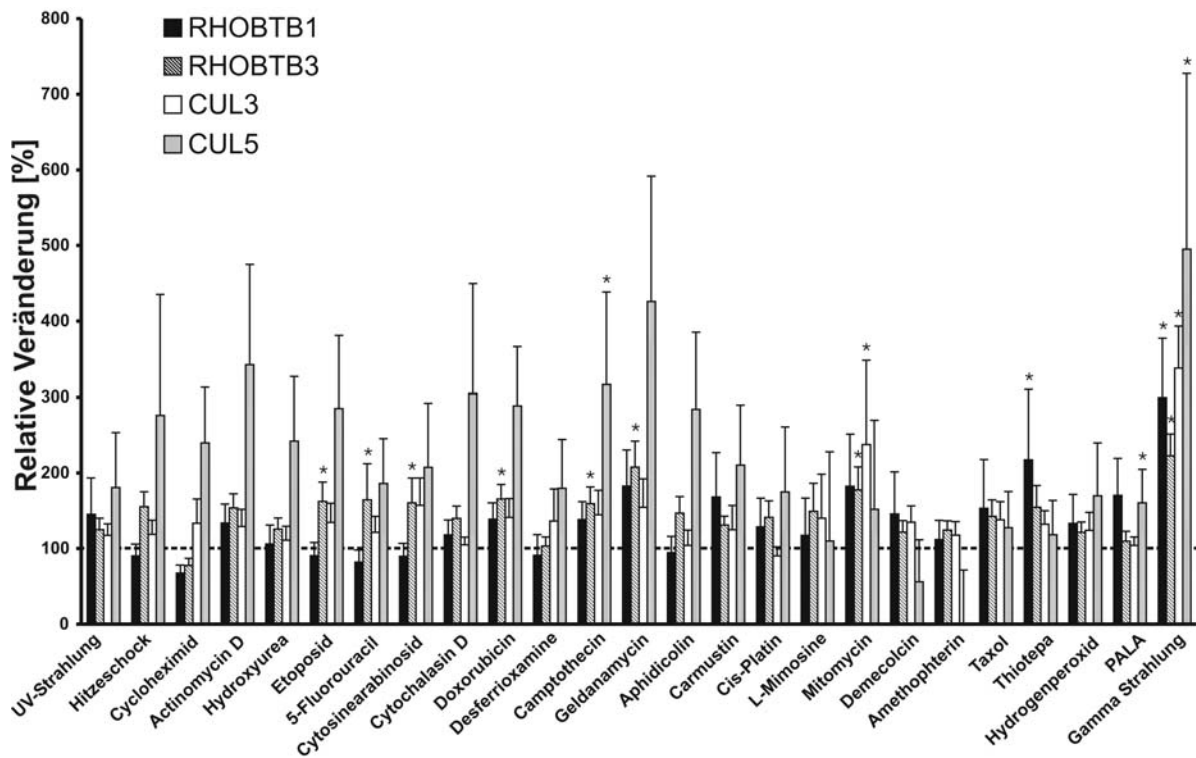


Abbildung 3.28 Die Expressionsänderungen von RHOBTB1, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Für jede Behandlung wurde die prozentuale Änderung der Expression von RHOBTB1, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 bezogen auf die unbehandelte Kontrolle in jeder Zelllinie berechnet. Die Daten wurden durch Quantifizierung der CCLPA-Membranen aus Abb. 3.27 mit Hilfe eines Phosphorimagers und ImageQuant Software abgeleitet. Mit jeder Probe wurde ein Hintergrundausgleich vorgenommen und die Werte mit den korrespondierenden Ubiquitin Proben normalisiert. Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*SEM, standard error of the mean*) sind dargestellt. Sterne markieren statistische Signifikanzunterschiede (two-way ANOVA; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$). Aufgrund fehlender Daten konnte für RHOBTB1 und CUL5 nur *one-way* ANOVA durchgeführt werden.

Eine breite Heterogenität in den Expressionsmustern von RHOBTB und CUL3 zeigte sich auch in der Analyse einzelner spezifischer Tumorzelllinien (Anhang Abb. A3). In Tumorzelllinien der Lunge ($n = 3$) waren RHOBTB1 und CUL3 durch fast alle Behandlungen hinunterreguliert, während RHOBTB3 erhöhte Expression aufwies. In Tumorzelllinien des Kolon ($n = 6$) bewirkten die Behandlungen in einigen Fällen einen Anstieg der RHOBTB1 Expression, RHOBTB3 und CUL3 waren häufig hinunterreguliert. Das Expressionsmuster in Tumorzelllinien der Brust ($n = 3$) verhielt sich entgegengesetzt der Kolonzelllinie. Hier waren RHOBTB3 und CUL3 Gene ähnlich niedrig exprimiert, während RHOBTB1 kein überwiegendes Expressionsmuster in eine Richtung präsentierte. In allen drei Gruppen veranlassten Gammastrahlen eine simultane Erhöhung der Expression.

3.10.4.1 Expressionsanalyse in der HCT116 Zelllinie

Der CCLPA beinhaltet die Kolonkarzinom-Zelllinien HCT116 und ihre Derivate HCT116 p21^{-/-} und HCT116 p53^{-/-}. In den Derivaten ist p21 bzw. das Tumorsuppressorgen p53 deletiert (Bunz et al., 1998, Waldmann et al., 1995), welches einen Vergleich der Auswirkungen verschiedener Behandlungen erlaubt (Abb. 3.29).

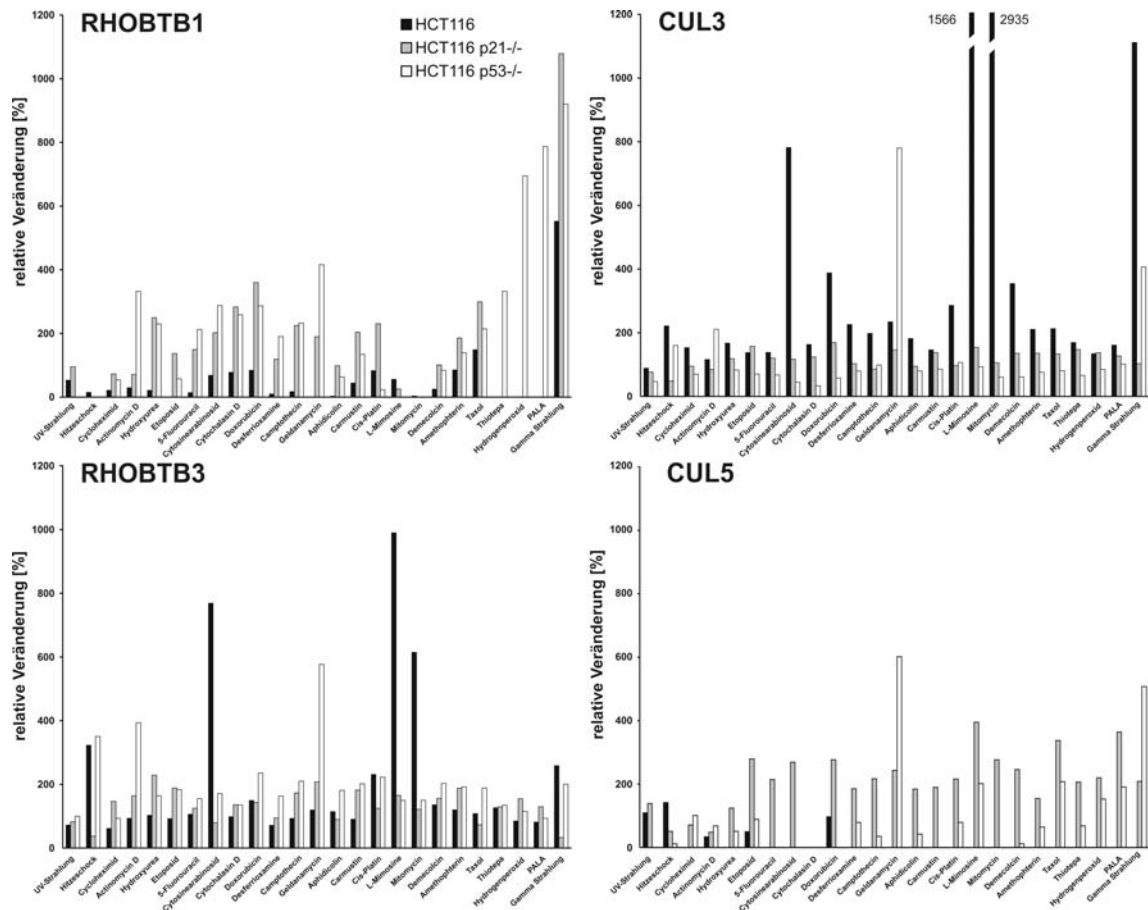


Abbildung 3.29 Expressionsveränderung von RHOBTB und CUL in einer Zelllinie HCT116 und ihre Derivate aus einem Kolonkarzinom. Für jede Behandlung wurde die Veränderung der Expression von RHOBTB1, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 wie in der Legende von Abb. 3.27 beschrieben berechnet. Aufgrund von Artefakten auf der Membran konnten für RHOBTB1 und CUL5 nicht alle Proben quantifiziert werden.

Es zeigte sich, dass durch viele Behandlungen der HCT116-Zellen RHOBTB1 in niedrigem Level exprimiert wird und der umgekehrte Effekt in den beiden anderen Zelllinien auftritt. Im Gegensatz dazu führen die Behandlungen bei CUL3 in HCT116-Zellen zu geringen Effekten und in p21^{-/-}- und p53^{-/-}-Zellen zu einer extrem niedrigen Expression des Gens. In fünf Behandlungen hat die Deletion von p21 und p53 den gleichen Effekt auf die Expression von RHOBTB3 und CUL3. Cytosinarabinosid, L-

Mimosin, Mitomycin und Gamma-Strahlung resultierten in einer Steigerung der Genexpressionlevel in HCT166, wobei die Derivate geringe Veränderungen oder Erniedrigung der Genexpression zeigten (~30-fach durch Mitomycin). Geldanamycin verursacht einen mäßigen Expressionsanstieg in HCT116 und HCT116 p21^{-/-}-Zellen, aber eine deutliche Zunahme in HCT116 p53^{-/-}-Zellen. Die relative Änderung der CUL5 Expression zeigte mit Actinomycin D und Gamma-Strahlung einen deutlichen Anstieg der Expression in p53^{-/-}-Zellen im Vergleich zu p21^{-/-}-Zellen und verhält sich somit wie die Expression von CUL3. Hingegen sind bei fast allen anderen Behandlungen, die auszuwerten waren, eine Erniedrigung der Expression in den p53^{-/-}-Zellen im Gegensatz zu den p21^{-/-}-Zellen zu detektieren, die mit den gleichen Effekten von CUL3 und nur zum Teil mit RHOBTB übereinstimmen.

3.10.4.2 Korrelationsanalysen von RHOBTB und CUL in einem CCLPA

Mit dem kompletten Datensatz von Zelllinien und Behandlungen wurden Veränderungen der Expressionslevel der RHOBTB Gene und des CUL3 Gens mit Korrelationsstudien analysiert. Für alle Zelllinien konnte eine sehr hohe Korrelation zwischen RHOBTB3 und CUL3 festgestellt werden ($y = 0,86x - 0,08$, $r = 0,6956$, $P = 6,3 \times 10^{-88}$; Anhang Abb. A4). Wechselbeziehungen zwischen RHOBTB1 und CUL3 waren schwach ($y = 0,15x + 0,02$, $r = 0,1929$, $P = 2,2 \times 10^{-48}$) und zwischen RHOBTB1 und RHOBTB3 mittleren Ausmaßes ($y = 0,21x + 0,09$, $r = 0,3665$, $P = 8,7 \times 10^{-48}$). Es stellte sich die Frage, ob die veränderten Expressionslevel aufgrund der einzelnen Zelllinien oder der speziellen Behandlung korrelierten. Die Korrelationen, in Tabelle 3.8 dargestellt, waren für fast jede Behandlung individuell zwischen RHOBTB3 und CUL3 sehr hoch. Für RHOBTB1 versus CUL3 und RHOBTB1 versus RHOBTB3 zeigten sich mäßige und mittlere Korrelationsergebnisse; nur in einigen Fällen konnte Signifikanz erreicht werden (5-Fluorouracil, Geldanamycin, Camptothecin, Carmustin und Cytochalasin D, gefolgt von Hitzeschock und Cis-Platin). Eine hohe Übereinstimmung der Korrelation zwischen RHOBTB3 und CUL3 wurde auch für individuell betrachtete Zelllinien gefunden (Anhang Tab. A1). Ausnahmen waren lediglich Ovarien-Adenokarzinom (SK-OV-3) und zwei Gehirn-Neuroblastome (SK-N-SH und IMR-32). Für RHOBTB1 und CUL3 wurden nur Korrelationen im Lungenkarzinom A549, vier Kolonkarzinom-Zelllinien, renalem Adenokarzinom ACHN und Brust-Adenokarzinom MCF7 gefunden. Für RHOBTB1 und RHOBTB3 waren Wechselbeziehungen im Lungenkarzinom A549, Ovarien-

Adenokarzinom SK-OV-3 und Kolon-Adenokarzinom COLO 587 ersichtlich, gefolgt von Leberkarzinom Hep G2, Gehirn-Neuroblastom SK-N-SH, renalem Adenokarzinom ACHN und Kolon-Adenokarzinom HT-29.

Tabelle 3.8 Korrelationsanalyse der Veränderung des Expressionslevel von RHOBTB vs. CUL3.

Behandlung	RHOBTB3 vs. CUL3		RHOBTB1 vs. CUL3		RHOBTB1 vs. RHOBTB3	
	r	t-Test	r	t-Test	r	t-Test
1 UV-Strahlung	0,6372	***	0,1702		0,2044	
2 Hitzeschock	0,7863	***	0,4330		0,5255	*
3 Cycloheximid	0,7150	***	0,2527		0,4117	
4 Actinomycin D	0,7787	***	0,4482	*	0,3176	
5 Hydroxyurea	0,6715	***	0,1299		0,3601	
6 Etoposid	0,7412	***	0,0709		0,1514	
7 5-Flourouracil	0,6948	***	0,2625		0,6712	**
8 Cytosinarabinosid	0,7851	***	0,1147		0,3273	
9 Cytochalasin	0,5486	*	0,2121		0,5188	**
10 Doxorubicin	0,4126		0,2879		0,1848	
11 Desferrioxamin	0,6717	***	0,0109		0,3593	
12 Camptothecin	0,7930	***	0,1659		0,5362	**
13 Geldanamycin	0,8174	***	0,4916	*	0,6298	**
14 Aphidicolin	0,7117	***	-0,1613		0,2314	
15 Carmustin	0,6050	**	0,1637		0,5564	**
16 Cis-Platin	0,7794	***	0,2296		0,4755	*
17 L-Mimosin	0,8787	***	0,2159		0,3974	
18 Mitomycin	0,8456	***	-0,2221		0,0045	
19 Demecolcin	0,6221	***	0,0731		0,2692	
20 Amethopterin	0,5445	**	-0,0062		0,3300	
21 Taxol	0,5831	**	0,4926		0,4771	
22 Thiotepa	0,6324	***	0,1867		0,3267	
23 Hydrogenperoxid	0,6405	***	0,1245		0,3629	
24 PALA	0,7086	***	0,2628		0,3390	
25 Gamma-Strahlung	0,5465	**	0,0690		0,1892	
26 gesamt	0,6956	***	0,1987	***	0,3708	***

Die Membran beinhaltet 26 verschiedene humane Tumorzelllinien, die jeweils mit 25 verschiedenen chemotherapeutischen Agenzien, oxidativen Stressinduktoren und Strahlung behandelt wurden. Die Kalkulation umfasst für jede Behandlung alle Zelllinien. $n = 488$ für RHOBTB1 und $n = 650$ für RHOBTB3 und CUL3. r = Korrelationskoeffizient. Sterne markieren statistische Signifikanzunterschiede mit Students t-Test ermittelt (*** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Korrelationsdaten für CUL5 und RHOBTB bzw. CUL3 wurden ebenfalls mit dem kompletten Datensatz von Zelllinien und Behandlungen bestimmt. Für alle Zelllinien konnte hier eine Korrelation zwischen RHOBTB3 und CUL5 ($y = 0,72x - 0,06$, $r = 0,3619$, $P = 3,13 \times 10^{-9}$), zwischen RHOBTB1 und CUL5 ($y = 0,79x + 0,01$, $r = 0,3778$, $P = 1,21 \times 10^{-9}$) und am höchsten zwischen CUL3 und CUL5 ($y = 0,51x + 0,08$, $r = 0,3916$, $P = 5,37 \times 10^{-10}$) festgestellt werden (Anhang Abb. A5). Individuell analysierte Behandlungen erbrachten für RHOBTB und CUL5 sowie CUL3 und CUL5 in einigen Fällen signifikante Korrelationen (Tab. 3.9). RHOBTB1, RHOBTB3 und CUL3 mit CUL5 zeigten simultane und hohe Korrelationswerte nach

Behandlung mit Geldanamycin und Mitomycin. Weiterhin wurden für RHOBTB3 und CUL5 hohe Korrelationen mit Cytosinarabinosid und für RHOBTB1 und CUL5 mit UV-Strahlen, Etoposid, Cytochalasin, Amethopterin, Hydrogenperoxid und Gammastrahlen gefunden. Eine hohe Übereinstimmung der Korrelation zwischen CUL3 und CUL5 wurde für fast alle individuell betrachteten Zelllinien gefunden (Anhang Tab. A2). Ausnahmen waren lediglich Kolonkarzinom HCT116, Brust-Adenokarzinom MCF7, Zervixkrebs HeLa und Hautmelanom SK-MEL-28. Für RHOBTB3 und CUL5 wurden Korrelationen in Lungenkarzinomen A549 und NCI-H460, zwei Kolonkarzinom-Zelllinien HCT-15 und HT-29, zwei renalen Adenokarzinomen ACHN und 786-O, zwei Brust-Adenokarzinomen MCF7 und MDA-MB-231, zwei Gehirnblastomen IMR32 und U-87-MG, Leberkarzinom Hep G2, Knochensarkom U-20S und Epidermoidkarzinom A431 gefunden.

Tabelle 3.9 Korrelationsanalyse der Änderung des Expressionslevel von RHOBTB vs. CUL5.

Behandlung	RHOBTB3 vs. CUL5		RHOBTB1 vs. CUL5		CUL3 vs. CUL5	
	r	t-Test	r	t-Test	r	t-Test
1 UV-Strahlung	0,1079		0,6100	***	0,1287	
2 Hitzeschock	0,1727		0,1937		0,2551	
3 Cycloheximid	0,3124		-0,1818		0,3636	
4 Actinomycin D	0,2977		0,5380	**	0,3174	
5 Hydroxyurea	0,2848		0,1148		0,2629	
6 Etoposid	0,2316		0,6842	***	0,3123	
7 5-Flourouracil	0,2852		0,0869		0,3977	*
8 Cytosinarabinosid	0,5245	**	0,3489		0,4675	*
9 Cytochalasin	0,4927	*	0,5556	**	0,5616	**
10 Doxorubicin	0,4311	*	0,4449	*	0,2570	
11 Desferrioxamin	0,4045	*	0,4179	*	0,4332	*
12 Camptothecin	0,4786	*	0,4316	*	0,4375	*
13 Geldanamycin	0,5820	**	0,5738	**	0,5379	**
14 Aphidicolin	0,4017	*	0,2757		0,4374	*
15 Carmustin	0,0942		0,0840		0,2268	
16 Cis-Platin	0,3142		0,0064		0,3306	
17 L-Mimosin	0,4409	*	0,1739		0,2541	
18 Mitomycin	0,5797	**	0,6888	***	0,5614	**
19 Demecolcin	0,4775	*	0,4705	*	0,5986	**
20 Amethopterin	0,1258		0,5084	**	0,0883	
21 Taxol	0,4938	*	0,6199	***	0,5786	**
22 Thiotepa	0,2694		0,4122	*	0,3975	*
23 Hydrogenperoxid	0,3967	*	0,5130	**	0,1852	
24 PALA	0,4140	*	0,5503	**	0,4634	*
25 Gamma-Strahlung	0,2082		0,4546	*	0,4376	*
26 gesamt	0,3619	***	0,3778	***	0,3916	***





Die Membran beinhaltet 26 verschiedene humane Tumorzelllinien, die jeweils mit 25 verschiedenen chemotherapeutischen Agenzien, oxidativen Stressinduktoren und Strahlung behandelt wurden. Die Kalkulation umfasst für jede Behandlung alle Zelllinien. n = 488 für RHOBTB1, n = 650 für RHOBTB3 und n = 547 für CUL5. r = Korrelationskoeffizient. Sterne markieren statistische Signifikanzunterschiede mit Students t-Test ermittelt (*** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05).

Für RHOBTB1 und CUL5 waren signifikante Wechselbeziehungen im Lungenkarzinom A549, Leberkarzinom Hep G2, Brust-Adenokarzinom MCF7, gefolgt von Kolon-Adenokarzinomen HCT116 p21^{-/-} und COLO587 zu finden.

3.11 Bindungspartner von RhoBTB Proteinen

Eine bakterielle Hefe Hybrid-Durchmusterung einer Mausgehirn-Bibliothek mit der C-terminalen Domäne (B1B2C) von RhoBTB3 zeigte bisher einige potentielle Kandidaten: Arp3, Zap3, Muf1, Mig2, Spectrin β V und bereits besprochenes Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 (F. Rivero, unveröffentlicht). Arp3 ist Teil des Arp2/3 Komplexes, der durch Aktivierung von Effektoren der Rho GTPasen an der Bildung von Aktinfilamenten beteiligt ist (Higgs und Pollard, 2001). Zap3 ist ein neues Protein im Nukleus über dessen Funktion nichts bekannt ist (Misawa et al., 2000). Ein interessanter potentieller Bindungspartner ist Muf1, der mit Cullin5 und Rbx1 assembliert und eine Ubiquitin Ligase aktiviert (Kamura et al., 2001). Mig2 rekrutiert Migfilin zu fokalen Adhäsionen (Tu et al., 2003). Spectrin β V gehört zur Spectrin Familie, die für Membranverankerungen wichtig sind (Broderick und Winder, 2005).

Tabelle 3.10 RhoBTB3 und mögliche Bindungspartner im Hefe Hybrid-System.

pAS \ pACT	Arp3	Zap3	Muf1
RhoBTB3-B1B2C 	+	+	+
RhoBTB3-B1 	-	-	-
RhoBTB3-B2 	-	-	-
RhoBTB3-C 	-	-	-

Verschiedene RhoBTB3 Domänen und Bindungspartner (Arp3, Zap3 und Muf1) wurden in Hefektoren kloniert. RhoBTB3-B1B2C enthält die BTB1, BTB2 und C-terminale Domäne und RhoBTB3-B1, RhoBTB3-B2 und RhoBTB3-C die jeweils einzelnen Domänen. Die Bindungspartner beinhalten jeweils den C-terminalen Bereich, der auch im Screening verwendet wurde. Das Hefe Hybrid-System zeigte eine schwache Interaktion mit den Bindungspartnern. + bezeichnet die relative Intensität der Blaufärbung, - bezeichnet keine Blaufärbung.

Im Hefe Hybrid-System wurden einige Bindungspartner bestätigt. Die Interaktion zwischen der RhoBTB3 Isoform und Arp3, Zap3 und Muf1 ist sehr schwach und konnte nur mit frisch ausgestrichenen Hefezellen detektiert werden (Tab. 3.10). Die Interaktion von RhoBTB3 mit Arp3 stellt eine Verbindung der Rho GTPase zum Aktinzytosklett her. Es ist denkbar, dass RhoBTB3 mit der Regulation von Arp3 Einfluss auf die Zellarchitektur und Zellbewegung ausübt. Die Bindung von Arp3 und RhoBTB3 konnte in einer ersten Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden. Säugetierzellen wurden mit RhoBTB3 als GFP-Fusionsprotein transfiziert, aufgeschlossen und mit gereinigten polyklonalen RhoBTB3 Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde im Western-Blot-Verfahren analysiert. Alle endogenen Bindungspartner von der RhoBTB3 Isoform, die in den Säugetierzellen enthalten sind, sollten zu präzipitieren sein. Tatsächlich konnte Arp3 als Bindungspartner *in vivo* festgestellt werden (Abb. 3.30). Unklarheiten bestehen über die zweite Bande mit einer Größe von ~94 kDa. Es müssen weitere Experimente zur Untersuchung der Interaktion folgen.

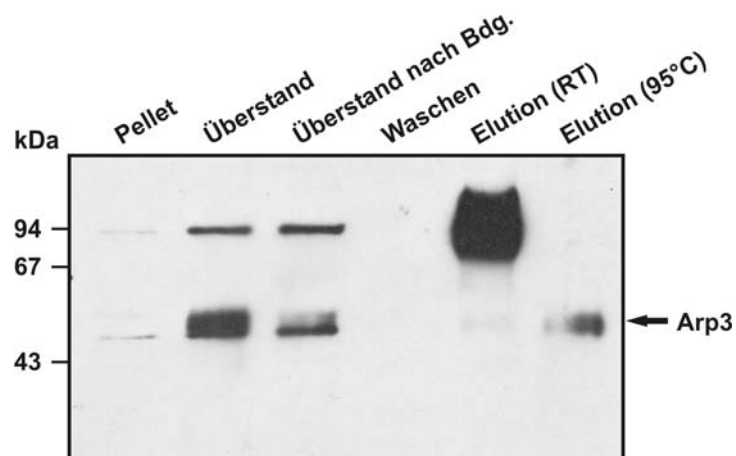


Abbildung 3.30 Arp3 bindet RhoBTB3 *in vivo*. COS7-Zellen wurden mit RhoBTB3 als GFP-Fusionsprotein transfiziert. RhoBTB3 wurde mit anti-RhoBTB3-Antikörper präzipitiert und in 12%-iger SDS-PAGE aufgetrennt. Der mögliche Bindungspartner Arp3 wurde im Präzipitat (5 min RT bzw. 5 min 95° C) mittels Western-Blot mit anti-Arp3-Antikörper erkannt. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären anti-Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz.

Die möglichen Bindungspartner Muf1 und Mig2 wurden *in vivo* mittels Koimmunpräzipitation bestätigt und der interagierende Bereich eingeschränkt (M. Kopp, 2006). Muf1 wird ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten, dass Muf1 im Nukleus lokalisiert ist. Bei Kotransfektionen mit RhoBTB2 oder RhoBTB3 und Muf1 zeigte sich, dass Muf1 im Zytoplasma vorhanden ist und mit RhoBTB kolokalisiert (M. Kopp, 2006).

4 Diskussion

Um die Charakterisierung und Funktion von RhoBTB Proteinen in der Tumorentstehung aufzudecken, wurden sowohl Aspekte der regulatorischen Signaltransduktionswege – insbesondere Adaptoren in Cullin3 Komplexen - als auch die Expression der RHOBTB Gene in tumoralen im Vergleich zu normalem Gewebe näher untersucht.

4.1 RhoBTB als Adaptor in Cullin-abhängigen Komplexen

Die untypische Struktur der kleinen GTPasen der RhoBTB Familie spricht für eine entscheidende Rolle als Regulationsproteine mit vielen molekularen Einflüssen auf verschiedene Signalwege. Die BTB Domäne ist eine konservierte Domäne, die in aktuellen Studien als Adaptor in Cullin3-abhängigen Ubiquitin Ligasekomplexen beteiligt ist (Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003; Furukawa et al., 2003; Geyer et al., 2003). Mitglieder der Cullin Familie bilden die Kernkomponenten von verschiedenen Ubiquitinkomplexen mit Ligaseaktivität (siehe Einleitung 1.4.3). Die BTB-beinhaltenen Proteine sind an der Erkennung der spezifischen Substrate durch weitere Domänen beteiligt. In *Caenorhabditis elegans* wurde das BTB-beinhaltenende Protein MEL-26 als eine Adaptorkomponente identifiziert, die für den Cullin3-abhängige Abbau von MEL-1 *in vivo* erforderlich ist. MEL-26 verfügt über die gleichen funktionellen Eigenschaften wie Skp1 und ElonginC. Sein Zielprotein MEL-1 wird für den Wechsel von Meiose zu Mitose benötigt (Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003). In *Schizosaccharomyces pombe* sind alle drei BTB Proteine des Genoms im Komplex mit Cullin3 (Pcu3p) und dem RING Protein Pip1p identifiziert worden (Geyer et al., 2003). Für RhoBTB2 und RhoBTB3 wurde eine Interaktion mit Cullin3 durch die erste BTB Domäne gezeigt (in dieser Arbeit gezeigt, siehe Ergebnisse 3.6.3; Wilkins et al., 2004). Der Interaktionsbereich von Cullin3 konnte in Hefestudien auf die ersten 41 Aminosäuren begrenzt werden (siehe Ergebnisse 3.6.1).

In Tumorzelllinien der Lunge wurde eine Mutation (Y284D) in der ersten BTB Domäne von RhoBTB2 gefunden, die eine Cullin3 Bindung verhindert. Als Folge bleibt der Abbau durch das Proteasomsystem aus und die Proteinlevel von RhoBTB2 steigen an (~5-fach; Wilkins et al., 2004.). Es wird postuliert, dass die Mutation nicht

in dem Interaktionsbereich von Cullin3, sondern in dem Dimerisierungsbereich von BTB Domänen liegt und eine korrekte Faltung des RhoBTB2 Proteins unterbindet (Stogios et al., 2005). Das würde bedeuten, dass eine Dimerisierung für die Cullin3 Bindung und folglich Ubiquitinierung erforderlich ist. Umgekehrt sind Mutationen in den Helices H2 und H5 von Cullin3 bekannt, die eine Interaktion mit RhoBTB2 verhindern (Wilkins et al., 2004). Die erste BTB Domäne beinhaltet eine 115 Aminosäuren lange Insertion, während die zweite BTB Domäne typischer ist und eng verwandt mit den BTB Domänen der BTB-BACK-kech Proteinen (Stogios et al., 2005). Die BTB Domänen sind direkt benachbart und wir konnten zeigen, dass sie Homodimere und als interessanten neuen Punkt auch Heterodimere ausbilden können (siehe Ergebnisse 3.3.1 und 3.3.2).

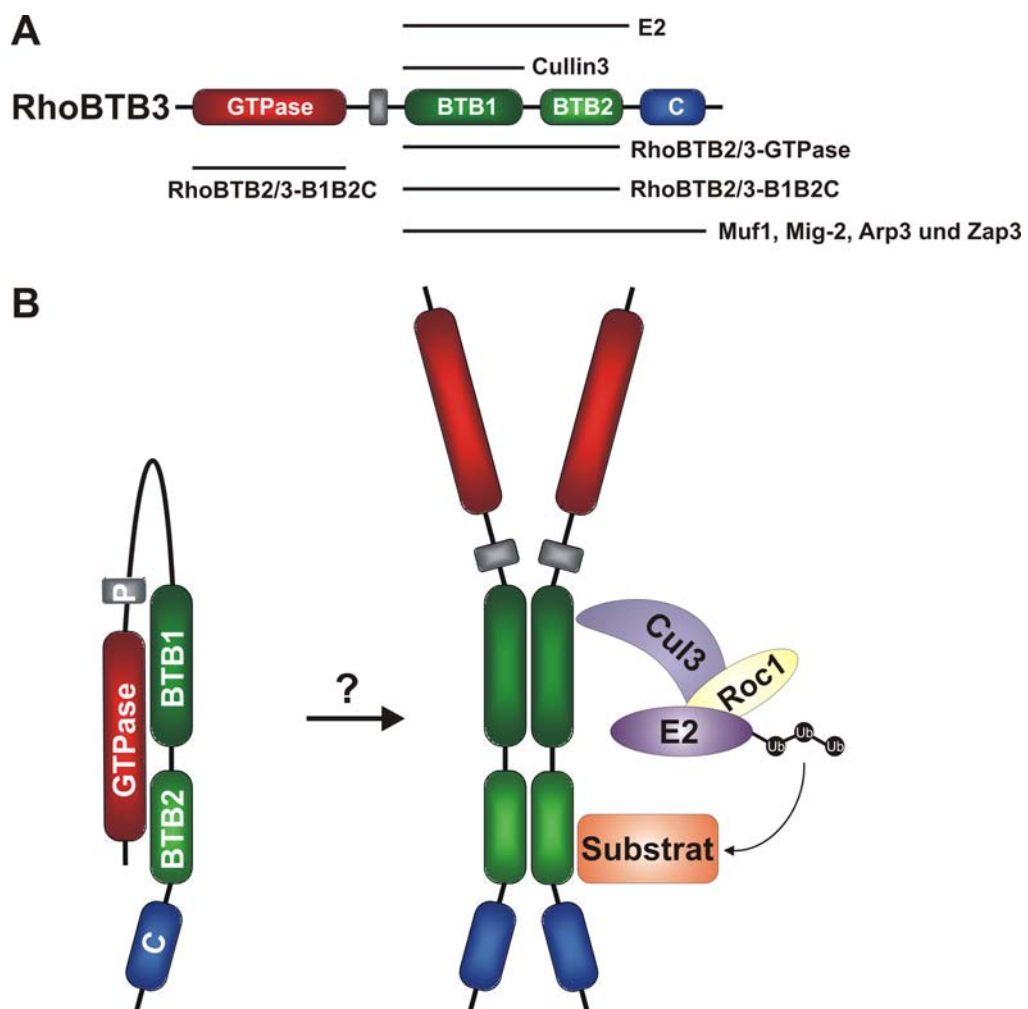


Abbildung 4.1 Regulationsmodell der RhoBTB Proteine. (A) Schematische Darstellung der Bindungsbereiche der RhoBTB Proteine bei Homo- und Heterodimerisierung sowie mit Cullin3, mit Ubiquitin-konjugierendem Enzym E2 und mit den Bindungspartnern Muf1, Mig-2, Arp3 und Zap3. (B) RhoBTB Proteine könnten durch Bindung der GTPase Domäne an die BTB Domänen reguliert werden. Durch einen bisher unbekanntem Mechanismus könnte die Protein-Interaktion aufgelöst und Homo- und Heterodimerisierung sowie die Ausbildung von Cullin-abhängigen Komplexen und anschließendem Transfer der Ubiquitinkette auf ein spezifisches Substrat ermöglicht werden.

In Analogie zu den BTB-Zink-Finger und BCL6 BTB Domänen, die obligatorisch als Dimer auftreten und nicht als stabile Monomere existieren können, ist davon auszugehen, dass auch bei den RhoBTB Proteinen durch eine Mutation in dem Interface zwischen den dimerisierenden BTB Domänen die Funktion aufgehoben wird (Melnick et al., 2000).

Aufgrund der Ähnlichkeit von BTB Domänen und Skp1 sowie ElonginC ist diese Ausbildung der Cullin3-abhängigen Komplexe wahrscheinlich dem bereits bekannten SCF-Komplex sehr ähnlich. Aminosäuren von Skp1 interagieren mit Cul1 an Positionen, die - übertragen auf BTB-beinhaltende Proteine - die Dimerisierung nicht auflösen würden. So entsteht ein Modell, indem durch die Dimerisierung von BTB Domänen die Cullin3-abhängige Komplexbindung sogar gesteuert wird. Tatsächlich sind Dimerisierungen von Adaptormolekülen bekannt (Maniatis, 1999). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der BTB Domänen in Proteinen mit zusätzlichen Domänen ist diese Anordnung auch auf die RhoBTB Proteine zu übertragen. Unsere Daten passen zu einem Modell, indem RhoBTB Proteine einen Komplex mit Cullin3, bilden, welcher sich in bekannter Weise erstreckt (Abb. 4.1). Dadurch kommen sich die Substratbindestelle des an RhoBTB-angelagerten Zielproteins und das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 für die Ubiquitinkettenübertragung räumlich sehr nahe. Ein präzises Strukturmodell erfordert die Kristallisation der BTB Domäne in RhoBTB Proteinen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass E2 auch direkt mit dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB2 und RhoBTB3 interagieren kann und dadurch die Ubiquitinübertragung möglicherweise unterstützt wird (siehe Ergebnisse 3.7.1). Das RING-Box Protein stabilisiert die Interaktion von Cullin3 und RhoBTB, obwohl es nur mit Cullin3 (F597-E615) direkt interagiert (siehe Ergebnisse 3.6.2; Furukawa et al., 2003). Während die Ergebnisse mit Cullin3 ineinander greifen, sind die Interaktionsstudien mit RhoBTB und weiteren Cullinen schwer zu analysieren. In Koimmunpräzipitationen war eine Bindung mit mehreren Cullinen festzustellen, aber nur eine Interaktion mit dominant negativem Cullin3 (siehe Ergebnisse 3.6.1 und 3.7.2). Die Interaktion mit dominant negativem Cullin3 war zudem stärker zu detektieren, da die katalytische Domäne am C-Terminus fehlt und somit keine Proteine ubiquitiniert werden können. Wir gehen davon aus, dass nur Cullin3 direkt mit RhoBTB und weitere Culline indirekt an die katalytische Domäne von Cullin3 *in vivo* binden. Unterstützt wird diese Vermutung durch Lokalisationsstudien in Zellen

(vgl. 4.2). Inkonsistent mit der Hypothese ist die Interaktion von Cullin5 mit RhoBTB2 und RhoBTB3 in Hefestudien. Möglicherweise ist diese Bindung ein Artefakt von Proteininteraktion, das durch veränderte Faltungen im Kern auftritt. Allerdings können im Hefe Hybrid-System Proteininteraktionen mit sehr geringer Affinität nachgewiesen werden und die Interaktion von Cullin5 mit RhoBTB Proteinen könnte generell erfolgen. Das würde bedeuten, dass die Affinität nur sehr gering ist oder Cullin5 in andere Komplexbildungen involviert ist und daher nicht detektiert werden konnte.

Zudem konnten wir als neuen Aspekt zeigen, dass die GTPase Domäne mit den BTB Domänen interagiert (siehe Ergebnisse 3.3.3). indem durch Selbstassoziation der BTB Domänen ein Komplex mit Cullin3, RING-Box Protein HRT1/Rbx1/Roc1 und Ubiquitin-konjugierendem Enzym E2 entsteht (Abb. 4.1). Diese intramolekulare Interaktion könnte die Formation von Dimeren und weiteren Komplexbildungen verhindern und somit als Regulationsmechanismus für RhoBTB Proteine fungieren. Alternativ können RhoBTB Proteine bereits als Dimere existieren, aber die Interaktion mit der GTPase Domäne verhindert die Cullin3 Bindung. Es bleibt zu klären, ob die Dimerisierung parallel oder antiparallel erfolgt. Da die einzelnen RhoBTB Domänen im Hefe Hybrid-System negativ waren, konnte dieser Aspekt nicht geklärt werden. Möglicherweise haben zudem die Prolin-reiche Region oder die Insertion der ersten BTB Domäne regulatorische Einflüsse. Die Prolin-reiche Region zwischen der GTPase Domäne und der ersten BTB Domäne könnte wie eine SH3- oder WW- Domänenbindestelle fungieren. Diese Domänen sind oft mit anderen typischen Domänen von Proteinen in Signaltransduktionsprozessen assoziiert (Macias et al., 2002).

4.2 Subzelluläre Lokalisation von RhoBTB Proteinen

In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von RhoBTB1, RhoBTB2 und RhoBTB3 untersucht. Alle drei RhoBTB Proteine werden in punktförmigen Strukturen exprimiert und sind um den Nukleus lokalisiert. Die Expression ist meist an einer Seite des Kerns erhöht. Für RhoBTB2 und RhoBTB3 konnte eine Kolokalisation festgestellt werden (siehe Ergebnisse 3.4.3), die zu den Ergebnissen der Heterodimerisierung passt (vgl. 4.1). Ursprünglich wurde vermutet, dass RhoBTB Proteine an Membranstrukturen verankert sind. Für RhoBTB1 und RhoBTB2 konnten sowohl

Golgi-Apparat als auch Lysosomen und frühen Endosomen ausgeschlossen werden (Aspenström et al., 2004). Wir gehen jetzt davon aus, dass die RhoBTB Proteine mit Cullinen und möglichen Bindungspartnern in Aggregaten zusammengefasst sind. Die bisherigen Ergebnisse für RhoBTB3 zeigen, dass das Prenylierungsmotiv des Proteins für die Lokalisation verantwortlich ist und einzelne Domänen diffus lokalisieren (siehe Ergebnisse 3.9.2). In vielen GFP-RhoBTB3-exprimierten Zellen entsprach das Muster dem des Golgi-Apparates. In der Tat werden isoprenylierte Proteine häufig zum Golgi-Apparat oder ER geleitet. Immunfluoreszenzaufnahmen mit den entsprechenden Markern in dieser Arbeit lieferten jedoch inhomogene Ergebnisse (siehe Ergebnisse 3.9.2). Das Expressionsmuster von RhoBTB3 Proteinen in PAE-Zellen zeigte keine Überlagerung mit Golgi-Markern, während in humanen HeLa-Zellen teilweise eine Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat auftrat. Dieser Befund kann auf unterschiedliche Proteinmengen oder auf eine unterschiedliche Herkunft der Zelllinien zurückgeführt werden. Humane HeLa-Zellen exprimieren endogenes RhoBTB3 (Ramos et al., 2002), während dies für die PAE-Zellen mit Schweineherkunft nicht bekannt ist. Zudem können die Zelllinien unterschiedliche Cullin Expressionsmuster aufweisen und die Lokalisation beeinflussen. Eine Kolokalisation mit dem ER konnte mit einem entsprechenden Marker ausgeschlossen werden (siehe Ergebnisse 3.9.2). Bei allen subzellulären Studien war die Stärke der Expression mitentscheidend für das Lokalisationsmuster. In manchen Fällen führte die Überexpression zu unspezifischen Ansammlungen der Proteine. Mit Lebendaufnahmen konnten wir zeigen, dass die Aggregate um den Nukleus spezifisch sind und nicht durch Fixierung entstanden sind. Wir haben gezeigt, dass RhoBTB Proteine direkt mit Cullin3 und wahrscheinlich indirekt mit weiteren Cullinen größere Komplexe bilden. Diese biochemischen Daten sollten mit Lokalisationsexperimenten in Säugetierzellen bekräftigt werden. Die Kolokalisation ist für eine Interaktion unerlässlich. In der Tat konnte mit allen Cullinen eine Überlagerung mit RhoBTB2 und RhoBTB3 festgestellt werden (siehe Ergebnisse 3.6.1). Allerdings wurde auch mit Cullin3, bei dem die ersten 41 Aminosäuren deletiert sind, eine Kolokalisation gefunden. Dieses Ergebnis kann nur mit Wechselwirkungen zwischen Cullin Komplexen erklärt werden, da eine direkte Bindung in Hefestudien ausgeschlossen werden konnte. Das Cullin3 Protein demonstriert normalerweise eine Lokalisation im Nukleus und am Golgi-Apparat (Singer et al., 1999). Ebenso ist ein Bindungspartner von RhoBTB3, Muf1,

normalerweise im Kern lokalisiert und zeigt in Kotransfektionen eine Überlagerung mit RhoBTB Proteinen außerhalb des Nukleus (M. Kopp, 2006). Muf1 kann mit Cullin5/Rbx1 assemblieren (Kamura et al., 2001). Da es zudem eine Kolo-kalisation mit RhoBTB Proteinen zeigt, sind Muf1 und Cullin5 sehr wahrscheinlich ein Bestandteil der RhoBTB Aggregate mit Cullin3.

Während dieser Arbeit sind die molekularen Anforderungen für die Aggregatbildung von RhoBTB1 und RhoBTB2 untersucht worden. Den beiden Isoformen fehlt ein Prenylierungsmotiv oder ein anderes Membranlokalisierungssignal, aber dennoch könnte der C-Terminus für die Verankerung verantwortlich sein (Ramos et al., 2002). Transfektionsstudien mit unterschiedlich deletierten Bereichen im C-Terminus von RhoBTB1 wurden durchgeführt. Wir konnten jedoch keine verantwortliche Sequenz für die Lokalisation von RhoBTB1 finden (siehe Ergebnisse 3.9.1). Zudem verändert ein RhoBTB1 Protein ohne den C-Terminus überraschenderweise nichts an der Aggregatbildung. Es ist denkbar, dass andere Bereiche der RhoBTB Proteine für die Lokalisation verantwortlich sind oder die Expressionsmuster durch die Zusammenlagerung vieler Komponenten zu großen Komplexen gebildet werden. Insbesondere könnten Heterodimerisierungen von RhoBTB1/RhoBTB2 mit RhoBTB3 eine Rolle spielen (vgl. 4.1). Wie die molekularen Eigenschaften der subzellulären Lokalisation mit der physiologischen Funktion der RhoBTB Proteine zusammenhängt, muss durch weitere Experimente gezeigt werden.

4.3 Expression der RhoBTB Proteine im Gewebe

Bisherige Experimente konnten eine ubiquitäre Expression von RHOBTB Genen feststellen, wobei RHOBTB1 hohe Expressionslevel in Herz, Niere sowie Testis und RhoBTB3 in Gehirn, Herz und Testis zeigen (Ramos et al., 2002). Der Bindungspartner Cullin3 wird ebenfalls ubiquitär exprimiert mit erhöhten Werten in Gehirn, Milz und Testis (Singer et al., 1999). Folglich sind die Grundlagen für eine funktionelle Wechselwirkung in Geweben gegeben.

In situ-Hybridisierungen während dieser Arbeit zeigten die spezifische Expression der RHOBTB Gene ausschließlich in Endothelzellen des Gefäßsystems und in früher Spermatogenese (siehe Ergebnisse 3.2.1). Eine Bestätigung lieferte die *in situ*-Hybridisierung von RHOBTB in Endothelzellen aus isolierten embryonalen Stammzellen. Auffallend war die Expression in bereits differenzierten Zellen,

sogenannten Klustern, höher als in undifferenzierten Zellen. Dieser Befund postuliert eine Beteiligung der RhoBTB Proteine an der Regulation der Angiogenese. Bei diesem fundamentalen Prozess werden neue Kapillaren aus bereits vorhandenen Gefäßen gebildet. Dieser Prozess tritt in früher embryonaler Entwicklung und in adultem Gewebe nur noch im weiblichen Fortpflanzungsorgan und in Wundheilungsprozessen auf. Einige pathologische Störungen der Angiogenese wie Tumorwachstum, diabetische Retinopathie und Schuppenflechte sind bekannt (Plate et al., 1994). Die Angiogenese unterliegt strengen Kontrollen durch stimulatorische und inhibitorische Faktoren, die daraufhin Rezeptor-vermittelte Signalwege beeinflussen. Ein relevanter Signalweg in Endothelzellen ist über VEGF/Flk-1/eNOS/Stickoxid/cGMP/Erk1/2 (Parenti et al., 1998). Die Aktivierung von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) führt zur Aktivierung von eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) durch Phosphorylierung des Ser177, Produktion von NO, Erhöhung von cGMP und Aktivierung der Proteinkinase Erk1/2. Die Kinase Erk1/2 phosphoryliert spezifische Zielmoleküle, die Zellwachstum und Differenzierungsprozesse auslösen. Für die Wachstumsprozesse von Tumoren ist die Angiogenese unerlässlich (Folkman, 2000). Die Tumorgroße ist ab wenigen Millimetern ohne Angiogenese limitiert, abhängig von der Überlebensfähigkeit des Tumors bei Hypoxie. Im Bezug auf die RhoBTB Proteine könnte dies eine regulatorische Beteiligung bedeuten. Die RhoBTB Proteine werden spezifisch in Endothelzellen einiger Gewebe exprimiert und könnten für Angiogenese benötigt werden. Unterstützt wird diese Vermutung durch eine *in situ*-Hybridisierungsstudie, die erhöhte Expression von RHOBTB2 während der Entwicklung des Herzens aufzeigen konnte (St-Pierre et al., 2004). Zudem konnten eine hohe und spezifische Expression in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems festgestellt werden. Wir konnten in adulten Gehirnen eine Expression von RhoBTB3 detektieren.

In dieser Arbeit wurde die spezifische Expression der RHOBTB Gene auch in Spermatozyten und Spermatozyten aus Testisgeweben gefunden (siehe Ergebnisse 3.2.1). In der Spermatogenese werden Spermien gebildet. Dabei können Spermatozyten, die sich zeitlebens teilen, zu Spermatozyten differenzieren und aus einem anschließenden Teilungsprozess gehen Spermatozyten hervor, die wiederum zu reifen Spermien ausreifen. Eine Expression von RHOBTB1 und RHOBTB3 zeigt sich auch hier in einem Entwicklungsprozess. Interessanterweise wird auch Cullin3 in

Testis exprimiert (Singer et al., 1999), was eine Koregulation in diesem Gewebe ermöglicht. Möglicherweise spielen die RhoBTB Proteine besonders in Zellen, die sich gerade entwickeln, eine Rolle. Eine Abberation in diesen Prozessen kann leicht zu einer Tumorentstehung führen.

4.4 RhoBTB Proteine in der Tumorentstehung

Ubiquitin-abhängige Abbauewege gewinnen immer größere Bedeutung in Zellwachstum und Proliferation. Es ist daher nicht überraschend, dass Aberrationen in diesem Signalweg zur Tumorentstehung führen können (Bashir und Pagano, 2003). In früheren Studien wurde RHOBTB2 in 3,5% Brusttumoren homozygot deletiert und seine Expression zu 50% in Brust- und Lungenkrebsproben reduziert vorgefunden (Hamaguchi et al., 2002). Eine weitere Studie von RHOBTB2 bei Harnblasenkrebs zeigte, dass die mRNA-Level in 9 von 12 Tumorzelllinien erniedrigt sind (Knowles et al., 2005). Eine Reduzierung der RHOBTB1-Expression (37%) wurde mit Heterozygotieverlust assoziiert, welches auf den Effekt des verlorenen Allels zurückzuführen ist (Beder et al., 2006). In allen aufgeführten Veröffentlichungen werden RHOBTB1 und RHOBTB2 als Tumorsuppressorgene postuliert. Es war daher von großem Interesse, die Studien auf alle Mitglieder der RhoBTB Familie auszudehnen.

Die Expressionsanalyse bei einem *cancer profiling array* zeigt eine simultane signifikante Erniedrigung der Expression von RHOBTB1, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 in Brust- und Nierentumoren und von RHOBTB1 und RHOBTB3 alleine zusätzlich in weiteren Geweben (siehe Ergebnisse 3.10.1; Abb. 3.24). Im Gegensatz dazu ist die Expression von RHOBTB2 für einen quantitativen Vergleich zwischen normalem und tumoralem Gewebe zu niedrig. Aus anderen Studien ist die niedrige RHOBTB2 Expression im Vergleich zu RHOBTB1 und RHOBTB3 bereits bekannt (Ramos et al., 2002). In einer Studie mit *in situ*-Hybridisierung schlug die Detektion von RHOBTB2 in Mammageweben der Maus fehl, obgleich RT-PCR-Analysen eine Expression in diesen Geweben zeigten (St-Pierre et al., 2004).

In dieser Arbeit war der Grad der Expressionsreduktion im Durchschnitt moderat (bis 2-fache Erniedrigung), aber in einer großen Anzahl von Proben innerhalb einer Gewebegruppe vorhanden. Zum Beispiel wurde RHOBTB1, RHOBTB3, CUL3 und CUL5 in 74%, 82%, 80% bzw. 82% der Brusttumorproben hinunterreguliert. Diese

Reduzierung der Expression ist nicht grundsätzlich mit Tumoren assoziiert, sondern auf einzelne Tumortypen begrenzt – insbesondere Brust- und Nierentumoren. Zudem war in einigen Geweben nur eines der untersuchten Gene niedrig exprimiert (RHOBTB3 in Uterus-, in Ovarien- und Lungentumoren). Dieser Befund stimmt mit den Daten von Knowles et al. (2005) bei Harnblasenkrebs überein. Hamaguchi et al. (2002) berichten, dass RHOBTB2 Expression in 42% der Brust- und 50% der Lungentumoren abgeschaltet ist, aber der Anteil von hinunterregulierten Genen wird wahrscheinlich noch größer sein. In Zelllinien der Haut wurde RHOBTB und CUL3 niedrig exprimiert, z.B. in einer Melanomzelllinie SK mel 23 mit geringen invasiven Eigenschaften und in malignen Keratinozyten II-4RT (siehe Ergebnisse 3.10.3; Abb. 3.26). Eine Rolle der Gene in Hauttumoren ist daher sehr wahrscheinlich und sollte näher untersucht werden.

In der Änderung der Expression wurden sehr gute Korrelationen zwischen RHOBTB3 und CUL3 erreicht und mäßige Korrelation zwischen RHOBTB1 und CUL3 in dem *cancer profiling array* (siehe Ergebnisse 3.10.2; Tab. 3.5). Die Korrelationskoeffizienten waren in einzelnen Geweben zum Teil sehr hoch (Brust und Uterus für RHOBTB1 und RHOBTB3; Magen für RHOBTB1). Dies lässt vermuten, dass RhoBTB Gene und CUL3 koreguliert sind. Studien mit einem *cancer cell line profiling array* untermauern die These. Hierbei ist die Population größer und die Daten sind homogener im Vergleich zum *cancer profiling array*, da für jede Zelllinie die behandelte Probe mit der unbehandelten Probe verglichen wurde. Eine Koregulation von RHOBTB und CUL3 postuliert eine zusammenhängende Funktion und passt ausgezeichnet zu der Rolle der RhoBTB Proteine als Adaptoren in Cullin-abhängigen Ubiquitin Ligase Komplexen.

Cul3 ist weitgehend in Säugergewebe exprimiert (Du et al., 1998). Inaktivierung des CUL3 Locus resultiert in früher embryonaler Letalität in der Maus und Defekten in früher Embryogenese in *C. elegans* (Singer et al., 1999; Kurz et al., 2002). Culline haben somit essentielle regulatorische Einflüsse. Mit der Tatsache, dass nahezu 200 Gene BTB Proteine im menschlichen Genom kodieren, könnten Cullin3-abhängige Komplexe Ubiquitinierung und Abbau von Tumor-verwandten Proteinen durch eine Vielzahl an Mechanismen kontrollieren. Bisher ist ein Regulationsmechanismus des Zellzyklus durch diese Komplexe bekannt. Die regulatorische Komponente Cyclin E wird zur Ubiquitinierung geführt (Singer et al., 1999).

Mehrere BTB Proteine wurden mit Tumorentstehung in Verbindung gebracht, bisher jedoch nicht in Kombination mit Cullin3-abhängigen Ubiquitin Komplexen. Das Tumorsuppressorgen HIC1 (*hypermethylated in cancer 1*) ist in einer Region auf Chromosom 17 lokalisiert, das in humanen Tumoren häufig hypermethyliert oder deletiert ist. Es arbeitet als Transkriptionsrepressor in Kooperation mit p53 in altersabhängiger Entwicklungsreduktion in Tumoren (Chen et al., 2005). Bcl-6 ist ein Transkriptionsrepressor in der Lymphsystementwicklung und -funktion und ein mögliches Onkogen. Das BCL-6 Gen ist in einer Region lokalisiert, die häufig chromosomale Translokation in non-Hodgkin Lymphomen vom B-Zelltyp impliziert (Ohno et al., 2004). Das kelch-verwandte Mayven soll Tumorwachstum durch Induktion von c-Jun und Cyclin D1 begünstigen (Bu et al., 2005). Ein weiteres Beispiel ist Kaiso. Es ist über p120-Catenin/Kaiso Signalwege an der Regulation von Genexpressionen und Krebsentstehung beteiligt (Park et al., 2005).

Die Rolle der Cullin-abhängigen Komplexe in der Tumorentstehung kann im weiteren Feld der Cullin Familie betrachtet werden, da jedes Mitglied Substrate mit Krebsbezug ubiquitiniert (zusammengefasst in Guardavaccaro et al., 2004). CUL5 ist ein potentielles Tumorsuppressorgen und in einer Region auf Chromosom 11 lokalisiert, die mit Heterozygotieverlust in Brusttumoren assoziiert ist (Fay et al., 2003). Der *cancer profiling array* zeigte eine moderate Reduzierung der CUL5 Expression in Brust-, Ovarien-, Rektum- und in Nierentumoren (siehe Ergebnisse 3.10.2; Abb. 3.24). Die Korrelationsanalysen in der Expressionsänderung zwischen CUL3 und CUL5 lieferte einen sehr hohen Koeffizienten ($r = 0,61$; $P = 4,45 \times 10^{-26}$; siehe Ergebnisse 3.10.1; Tab. 3.6). Es ist anzunehmen, dass in einigen Geweben Cullin3- und Cullin5-abhängige Komplexe kooperieren oder simultan in der Tumorentstehung involviert sind.

Die genaue Rolle der RhoBTB-abhängigen Cullin Komplexe in der Tumorentstehung ist unbekannt. Siripurapu et al. (2005) haben eine Expressionsanalyse in HeLa-Zellen mit manipulierter RHOBTB2 Expression ausgearbeitet. RHOBTB2 zeigte regulatorische Eigenschaften auf das Zellwachstum (durch Zellzykluskontrolle und Apoptose), das Zytoskelett und den Membrantransport. Zusammen mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten wird eine Rolle für Cullin3-RhoBTB Komplexen in der Regulation der Zellproliferation bestärkt. CUL und RHOBTB Gene sind in Tumorzellen niedrig exprimiert, wobei die meisten Behandlungen, die zur Inhibition des Zellwachstums führen, von gesteigerter Expression begleitet sind. Zudem ist

RHOBTB2 selten mutiert, aber häufig hinunterreguliert in Tumoren, was einen alternativen Inaktivierungsmechanismus vermuten lässt, z.B. Promotor-Hypermethylierung (Knowles et al., 2005). In einer anderen Studie wurde RHOBTB1 Expression häufig mit Allelverlust assoziiert, aber keine somatische Mutation detektiert. Die Promotorregion von RHOBTB1 zeigt einen hohen GC-Anteil mit zahlreichen CpG Bereichen, die - wie bei RhoBTB2 - einen epigenetischen Regulationsmechanismus darstellen könnten (Beder et al., 2006). Es ist zu erwarten, dass auch RHOBTB3 einen solchen Mechanismus besitzt und selten in Tumoren mutiert ist.

4.5 Einflüsse verschiedener Behandlungen auf RHOBTB Gene

Zellen verbleiben nach DNA-Schädigung an dem Kontrollpunkt G1- zur S-Phase oder G2- zur M-Phase. Der Einhalt G1-S wird durch p53-regulierte Synthese des Zellzyklus-Inhibitors p21 bewirkt, der den für den Übergang nötigen Cyclin-Cdk Komplex inhibiert. Die Kolonzelllinie HCT116 besitzt intakte DNA-abhängige und Spindel-abhängige Kontrollpunkte für Schädigungen (Waldman et al., 1995). Es wurde mit p21 und p53 deletierten HCT116 die Auswirkungen von DNA-Schäden überprüft (siehe Ergebnisse 3.10.4; Abb. 29). UV-Strahlung und Gamma-Strahlung führten zu einem Anstieg von RHOBTB1 und Abstieg von RHOBTB3 und CUL3 Expression. Die Behandlung mit DNA-Synthese Inhibitoren, 5-Fluorouracil und Cytosinarabinosid, zeigte Hochregulation von RHOBTB und Hinunterregulation von CUL3 in den veränderten Zelllinien im Kontrast zur intakten HCT116 Zelllinie. Die mögliche Funktion von p21 und p53 im Bezug auf den G2 Stop resultierte in eine unterschiedliche Expression von RHOBTB und CUL3. Für den längeren Arrest von HCT116-Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus ist p53 essentiell und dessen Suppression führt zur Zellproliferation (Tayler et al., 2001) Fehlt p53 führt der Verlust von dem negativen Regulatoren p21 des Zellzyklus zu erhöhtem Zellwachstum (Harper et al., 1993). Die Expressionen von RHOBTB1 und RHOBTB3 in deletierten Zellen postuliert unterschiedliche Beziehungen der Proteine zu den DNA-Kontrollpunkten. Wir vermuten, dass p21 und RhoBTB3 in einer Wechselbeziehung stehen und p21 möglicherweise auf bisher unbekannte Weise RhoBTB reguliert. Gamma-Strahlung lässt die Expression der drei Gene in allen untersuchten Zelllinien stark ansteigen. Eine Schädigung der DNA wird entweder durch die direkte Ionisierung von DNA-Komponenten induziert oder indirekt durch die Ionisierung von

H₂O₂, welches die Konzentration an reaktiven Sauerstoffprodukten erheblich steigert. Weitere Behandlungen rufen hohe Änderungswerte der RHOBTB Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen hervor. Geldanamycin bindet spezifisch an das Hitzeschockprotein Hsp90, induziert Destabilisierung/Inaktivierung von HIF-1 und führt zur erniedrigten Substratexpression (Neckers, 2006). L-Mimosin soll Zellen in der späten G1-Phase an einem regulatorischen Schritt inhibieren und ist ein starker Inhibitor der DNA-Replikation von Chromosomen in Säugetiernuklei. Die Antworten von RHOBTB auf diese Behandlungen kann eine Beteiligung der Proteine in den aufgeführten Signalwegen bedeuten und eröffnet ein weites Spektrum an neuen Untersuchungen.

CUL3 zeigt eine erhöhte Expression in Kolontumorzellen im Vergleich zu normalen Kolonzellen (Maeda et al., 2001). Im *cancer cell line profiling array* konnte dieser Anstieg ebenfalls in Kolonkarzinom HCT116 und Kolon-Adenokarzinomen HCT-15 und COLO 587 festgestellt werden (siehe Ergebnisse 3.10.4). Der Effekt der Expressionserhöhung ist nicht auf Gewebeproben zu übertragen, wo eine Reduktion der CUL3-Expression zu finden war (~1,2 fach, P = 0,035; siehe Ergebnisse 3.10.1, Abb. 24). Ein potentiell Tumorsuppressorgen in Brusttumoren ist das ATM Gen. Studien zeigten keine Änderung der Expression von ATM und CUL5 in Östrogen-Rezeptor- α positiven (MCF-7) und Östrogen-Rezeptor- α negativen (MDA-MB-231) humanen Tumorzelllinien der Brust im Vergleich zu nicht kanzerogenen Zelllinien (Fay et al., 2003). Bei dem *cancer cell line profiling array* präsentierten MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen aufgrund der Behandlungen in den meisten Proben eine Erniedrigung der Expression von RHOBTB3 und CUL3. RHOBTB1 zeigte keine auffälligen Tendenzen. Korrelationen zeigen einen hohen Koeffizienten für RHOBTB3 vs. CUL3, jedoch moderate für RHOBTB3 vs. CUL5 und CUL3 vs. CUL5 in diesen Zelllinien. Ob CUL5 tatsächlich in die Tumorentstehung mit dem vermuteten Cullin3- abhängigen Komplex mit RhoBTB involviert ist, muss mit anderen Studien näher untersucht werden.

4.6 Modell der RhoBTB Proteine in der Tumorentstehung

Diese Arbeit zeigt die Involvierung der RHOBTB Gene in der Tumorentstehung spezifischer Tumortypen, insbesondere Brust- und Nierentumoren. In Analogie zu dem bereits bekannten VBC-Cul2 Modell (vgl. Einleitung 1.4.3) in der

Tumorentstehung könnten RhoBTB Proteine mittels Cullin3-abhängiger Ubiquitin Ligase Komplexe spezifische Substrate zum Abbau führen. Möglicherweise ist Cullin5 als weitere Komponente beteiligt. Suppression oder Reduzierung der Expression von RhoBTB Proteinen würde in Akkumulation der Substrate und Zellproliferation resultieren (Abb. 4.2). Die Identifizierung der Zielsubstrate kann weitere Einblicke sowohl in die Tumorentstehung als auch in die Involvierung der RhoBTB Proteine in Signalwege liefern. Als Bindungspartner von RhoBTB3 wurde Muf1 identifiziert und bestätigt (M. Kopp, 2006). MUF1 ist ein Leucin-reiches Protein mit N-terminaler BC-Box und kann sich mit einer Cul5/Rbx1-Einheit zusammensetzen. Es wird ubiquitär exprimiert. Es ist denkbar, dass Muf1 durch den RhoBTB-abhängigen Ubiquitin-Ligase-Komplex abgebaut wird oder regulatorische Funktion auf weitere Substrate ausübt. Eine weitere Möglichkeit wäre der Muf1-vermittelte Abbau von RhoBTB Proteinen durch einen Cullin5-abhängigen Ubiquitin Komplex. Weitere Interaktionspartner und potentielle Substrate sind Arp3 und Mig-2 (siehe Ergebnisse 3.11; M. Kopp, 2006). Arp3 ist Teil des Arp2/3-Komplexes und für die Aktinpolymerisation wichtig, während Mig-2 Migfilin zu den Zell-Adhäsionen rekrutiert wird (Higgs und Pollard, 2001; Tu et al., 2003). Bisherige Experimente konnten den RhoBTB Proteinen keinen großen Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts zuweisen (Aspenström et al., 2004). Dennoch könnten RhoBTB Proteine möglicherweise den Abbauprozess von Arp3 und Mig-2 durch das Proteasom regulieren. Es ist von großer Bedeutung die erwähnten Substrate zu untersuchen, um die Signalwege der RhoBTB Proteine aufzudecken.

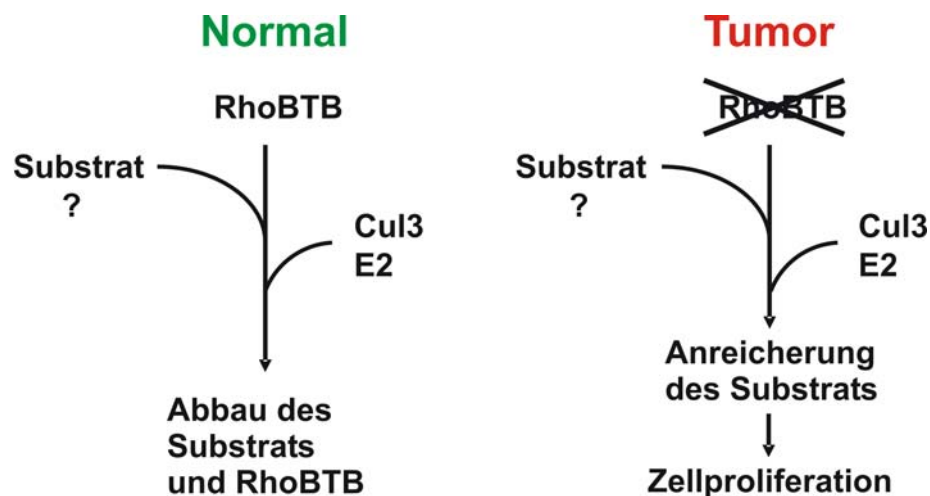


Abbildung 4.2 Funktionsmodell von RhoBTB in der Tumorentstehung. In normalem Gewebe könnte RhoBTB spezifische Substrate mit Hilfe von Cullin3-abhängigen Komplexen zum Abbau führen. Möglicherweise ist auch Cullin5 in diesen Prozess beteiligt. Suppression der RhoBTB Proteine im Tumorgewebe könnte zur Blockierung der Ubiquitinierung und Akkumulation der Substrate führen.

4.7 Ausblick

Diese Arbeit lieferte Daten für die Annahme, dass RhoBTB Proteine einen intramolekularen Regulationsmechanismus aufweisen und mit Hilfe von Ubiquitin-abhängigen Cullin3 Komplexen den Abbau von spezifischen Substraten regulieren, die an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt sind. Die molekularen Mechanismen der RhoBTB Proteine sind bisher nur teilweise bekannt und es ist eine Herausforderung diese mit der Rolle der Proteine in der Tumorentstehung und Angiogenese zu verbinden. Es können Mutationen in den BTB Domänen eingeführt werden, die die Cullin Interaktion und somit den Abbau der Substrate und der RhoBTB Proteine verhindern. Es sind bisher für RhoBTB2 in Tumoren drei Mutationen in der ersten BTB Domäne bekannt (Y284N, D229N und D368A). Es wäre anschließend interessant zu untersuchen, ob diese Mutationen in Tumoren die Cullin Interaktion und Wachstumsprozesse beeinflussen. Aspekte der Angiogenese können mit manipulierten RhoBTB3-Level in Endothelzelllinien untersucht werden. Parameter wie Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung lassen sich in diesem Modell durch Behandlung mit Aktivatoren (VEGF) oder Inhibitoren (Endostatin, Angiostatin) der Angiogenese untersuchen. Eine Identifizierung sowohl der Substrate für eine Ubiquitinierung als auch möglichen weiteren Regulatoren ist zwingend notwendig, um die beteiligten Signalwege aufzudecken. Bisher sind einige Interaktionspartner von RhoBTB3 bekannt, die bestätigt und näher untersucht werden sollten. Zum einen sind die Bindungspartner potentielle Substratkandidaten oder an Ubiquitinierungsprozessen wie dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym E2 und Muf1, welches mit RING-Box Faktoren und Cullin5 assemblieren kann, beteiligt. Mit Hilfe von Ubiquitinierungsexperimenten soll gezeigt werden, ob RhoBTB Proteine bzw. ihre Substrate tatsächlich über Cullin3 (oder Cullin5) mit Ubiquitinketten verknüpft werden. Bisher konnte eine Ubiquitinierung für RhoBTB2 durch Cullin3-abhängige Ligaseaktivität gezeigt werden. Die Überprüfung der Ansätze sollte mit gereinigten RhoBTB Proteinen erfolgen, welche bisher aufgrund der Unlöslichkeit der Proteine nicht möglich war. Weiterhin können subzelluläre Untersuchungen und Komplexbildungen von RhoBTB in Zelllinien getestet werden, denen Cullin3 und somit Cullin3-Aktivität fehlt. Die aufgeführten Studien sollten durch die Analyse der *in vivo* Effekte mit Deletion der RhoBTB Proteine in Mausmodellen komplementiert werden.

5 Zusammenfassung

Rho Proteine sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Vesikeltransport, Morphogenese, Mikrotubuli-Organisation, Zytokinese, Genexpression, Zellzyklus-Progression, Apoptose und Tumorigenese beteiligt. Alle Mitglieder agieren als molekulare Schalter, indem sie zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Status wechseln. Eine Subfamilie der Rho GTPasen, die RhoBTB, wird in Vertebraten durch drei Isoformen repräsentiert. Sie umfassen ca. 600 Aminosäuren und werden durch eine GTPase Domäne, eine prolinreiche Region, einem Tandem von zwei BTB Domänen und einem Carboxylterminus von unbekannter Funktion charakterisiert. *In situ*-Hybridisierungen zeigten, dass RHOBTB1 und RHOBTB3 spezifisch in Endothelzellen und Spermatischen exprimiert werden, was auf eine Funktion in Entwicklungsprozessen wie der Angiogenese und Spermatogenese hindeutet. Veröffentlichungen zeigten, dass BTB Domänen an der Ausbildung von Cullin3-abhängigen Ubiquitin Ligasen beteiligt sind. Zudem werden RhoBTB2/DBC2 und RhoBTB1 als Kandidaten für Tumorsuppressorgenen diskutiert. Das Ziel dieser Arbeit ist die Rolle der RhoBTB Proteine in der Tumorentstehung zu entschlüsseln und die Signalwege aufzudecken, in die sie involviert sind. Zunächst haben wir die Bindung der RhoBTB Proteine mit Cullinen bewiesen. Hefe Hybrid-Analysen zeigten Interaktionen mit RhoBTB2 sowie dem C-terminalen Bereich (B1B2C) von RhoBTB3 mit Cullin3 und Cullin5 durch das Tandem der BTB Domänen. Die Bindung mit RhoBTB konnte hierbei auf die ersten 41 Aminosäuren von Cullin3 begrenzt werden. Mit Koimmunpräzipitations-experimenten wurde die Bindung bestätigt und weiterhin gezeigt, dass die erste BTB Domäne von RhoBTB3 mit Cullin3 interagiert. Auf die gleiche Weise wurde Homodimerisierung von RhoBTB3 und interessanterweise Heterodimerisierung von RhoBTB3 mit RhoBTB2 durch die BTB Domänen gezeigt. Ein ganz neuer Aspekt war die Interaktion der GTPase Domäne von RhoBTB2 sowie RhoBTB3 mit den BTB Domänen. Wir postulieren, dass diese intramolekulare Interaktion der GTPase Domäne und der BTB Domäne die regulatorische Funktion übernimmt. Die Bindung könnte die Dimerisierung, die möglicherweise für die Formation von Cullin3 Komplexen und Substraten mit RhoBTB Proteinen nötig ist unterbinden. RhoBTB3 zeigte auch eine Interaktion mit Ubiquitin-konjugierendem Enzym E2, welches die Ubiquitinkette auf

die Substrate überträgt. Neben den noch unbekanntem Substraten wird RhoBTB3 selbst im Proteasom abgebaut. Zur Entschlüsselung der Rolle in der Tumorentstehung wurden Expressionsmuster von RHOBTB und CUL Genen mit Hilfe eines *cancer profiling arrays* und *cancer cell line profiling array* analysiert. RHOBTB zeigte in allen Nierenproben und in 80% der Brustproben niedrigere Expression in tumoralen Geweben als in normalen Geweben. Es bestehen hohe Korrelationen in der Änderung der Expressionslevel zwischen RHOBTB3 und CUL3, was auf eine Ko-Regulation der Proteine hindeutet. Untersuchungen der subzellulären Lokalisation zeigten für alle drei Isoformen eine Expression als punktförmige Struktur um den Nukleus. In diesem Bereich kolokalisieren die RhoBTB Proteine mit allen Cullinen und lassen eine große Komplexbildung in Aggregaten vermuten. Wir postulieren ein Modell, in dem RhoBTB Proteine durch Formation von Cullin Komplexen zum Abbau spezifischer Substrate führen und die Suppression der RhoBTB Proteine zur Anreicherung der Substrate und Zellproliferation führt.

6 Abstract

Rho proteins have been implicated mainly in the regulation of the cytoskeleton, but also in vesicle trafficking, phagocytose and transcriptional activation. They also participate in tumorigenesis, where some of them are overfunctional. A subfamily of Rho GTPases, RhoBTB proteins, is represented by three isoforms in vertebrates: RhoBTB1, RhoBTB2 and RhoBTB3. They are around 600 amino acids long and consist of a GTPase domain, a proline-rich region, two BTB domains and a carboxyl-terminal region of unknown function. *In situ*-hybridisation studies of RHOBTB1 and RHOBTB3 yielded specific expression in endothelial cells and spermatides, suggesting a function in developmental processes like angiogenesis and spermatogenesis. Recent reports demonstrate that BTB domains are involved in the formation of cullin3-dependent ubiquitin ligase complexes. In addition, RHOBTB2/DBC2 and RHOBTB1 have been proposed as candidates for tumor suppressor genes. The aim of this thesis is to identify the role of RhoBTB proteins in oncogenesis and to uncover the signal transduction pathways in which these proteins are involved. First we examined the binding of RhoBTB proteins to cullins. Two hybrid experiments yielded interaction between RhoBTB2 and the C-terminal part of RhoBTB3 with cullin3 and cullin5 through both BTB domains. The binding of cullin3 is restricted to to the first 41 amino acids. We confirmed this finding *in vivo* by coimmunoprecipitation studies and could further show, that the first BTB domain of RhoBTB2 is responsible for this interaction. Using a similar approach we also showed dimerization of RhoBTB3 and interestingly heterodimerization of RhoBTB3 and RhoBTB3 through the BTB domains. It turned out that the GTPase domain is able to interact with the BTB domains. We propose a model in which masking of the targeting function of the BTB domain for interaction with cullin3 complexes and/or substrates is mediated by the intramolecular interaction between the catalytic GTPase domain and the BTB domains. Furthermore, RhoBTB3 interacts with the ubiquitin-conjugating enzyme E2 that transfers the ubiquitin chain to a specific substrate. In addition to unidentified substrates, RhoBTB3 might also be itself degraded in the proteasome. To address the role of RhoBTB in tumorigenesis we analysed the expression profile of RHOBTB genes using a *cancer profiling array* and a *cancer cell line profiling array*. We observed a decrease in RhoBTB expression in all kidney tumor samples and about 80% of breast samples versus the matched

normal tissue. High correlation exists in the expression changes of RHOBTB3 and CUL3 suggesting that these genes are co-regulated. Subcellular localization studies of all RhoBTB isoforms showed speckled dots around the nucleus where also cullins colocalize, probably in large complexes. We envision a model in which RhoBTB proteins target specific substrates for degradation by formation of cullin complexes and suppression of RhoBTBs results in accumulation of the target followed by cell proliferation.

7 Literatur

- Aravind, L., and E.V. Koonin. 2000. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol.* 10:R132-4.
- Aspenstrom, P., A. Fransson, and J. Saras. 2004. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 377:327-37.
- Aznar, S., and J.C. Lacal. 2001. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett.* 165:1-10.
- Bardwell, V.J., and R. Treisman. 1994. The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* 8:1664-77.
- Bashir, T., and M. Pagano. 2003. Aberrant ubiquitin-mediated proteolysis of cell cycle regulatory proteins and oncogenesis. *Adv Cancer Res.* 88:101-44.
- Beder, L.B., M. Gunduz, M. Ouchida, E. Gunduz, A. Sakai, K. Fukushima, H. Nagatsuka, S. Ito, N. Honjo, K. Nishizaki, and K. Shimizu. 2006. Identification of a candidate tumor suppressor gene RHOBTB1 located at a novel allelic loss region 10q21 in head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 132:19-27.
- Bos, J.L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49:4682-9.
- Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349:117-27.
- Broderick, M.J., and S.J. Winder. 2005. Spectrin, alpha-actinin, and dystrophin. *Adv Protein Chem.* 70:203-46.
- Bu, X., H.K. Avraham, X. Li, B. Lim, S. Jiang, Y. Fu, R.G. Pestell, and S. Avraham. 2005. Mayven induces c-Jun expression and cyclin D1 activation in breast cancer cells. *Oncogene.* 24:2398-409.
- Bullock, W.O. 1987. *Biotechniques.* 5:376-378.
- Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J.P. Brown, J.M. Sedivy, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 282:1497-501.
- Burridge, K., and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 116:167-79.
- Carey, T.E., T. Takahashi, et al. 1976. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:3278-82.

- Chen, W.Y., D.H. Wang, R.C. Yen, J. Luo, W. Gu, and S.B. Baylin. 2005. Tumor Suppressor HIC1 Directly Regulates SIRT1 to Modulate p53-Dependent DNA-Damage Responses. *Cell*. 123:437-48.
- Choy, E., V.K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I.E. Ivanov, and M.R. Philips. 1999. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*. 98:69-80.
- Dias, D.C., G. Dolios, R. Wang, and Z.Q. Pan. 2002. CUL7: A DOC domain-containing cullin selectively binds Skp1.Fbx29 to form an SCF-like complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:16601-6.
- Du, M., L. Sansores-Garcia, Z. Zu, and K.K. Wu. 1998. Cloning and expression analysis of a novel salicylate suppressible gene, Hs-CUL-3, a member of cullin/Cdc53 family. *J Biol Chem*. 273:24289-92.
- Ellis, S., and H. Mellor. 2000. Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol*. 10:85-8.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629-35.
- Fay, M.J., K.A. Longo, G.A. Karathanasis, D.M. Shope, C.J. Mandernach, J.R. Leong, A. Hicks, K. Pherson, and A. Husain. 2003. Analysis of CUL-5 expression in breast epithelial cells, breast cancer cell lines, normal tissues and tumor tissues. *Mol Cancer*. 2:40.
- Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:7413-7.
- Flick, J.S., and M. Johnston. 1990. Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 10:4757-69.
- Folkman, J. 2000. Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 92:94-5.
- Fransson, A., A. Ruusala, and P. Aspenstrom. 2003. Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem*. 278:6495-502.
- Freemont, P.S. 1993. The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann N Y Acad Sci*. 684:174-92.
- Furukawa, M., Y.J. He, C. Borchers, and Y. Xiong. 2003. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol*. 5:1001-7.

- Geyer, R., S. Wee, S. Anderson, J. Yates, and D.A. Wolf. 2003. BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol Cell*. 12:783-90.
- Glickman, M.H., and A. Ciechanover. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 82:373-428.
- Gomez del Pulgar, T., S.A. Benitah, P.F. Valeron, C. Espina, and J.C. Lacal. 2005. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays*. 27:602-13.
- Guardavaccaro, D., and M. Pagano. 2004. Oncogenic aberrations of cullin-dependent ubiquitin ligases. *Oncogene*. 23:2037-49.
- Guasch, R.M., P. Scambler, G.E. Jones, and A.J. Ridley. 1998. RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol*. 18:4761-71.
- Haas, A.L., and T.J. Siepmann. 1997. Pathways of ubiquitin conjugation. *Faseb J*. 11:1257-68.
- Hamaguchi, M., J.L. Meth, C. von Klitzing, W. Wei, D. Esposito, L. Rodgers, T. Walsh, P. Welcsh, M.C. King, and M.H. Wigler. 2002. DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13647-52.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166:557-80.
- Hancock, J.F., H. Paterson, and C.J. Marshall. 1990. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*. 63:133-9.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 75:805-16.
- Higgs, H.N., and T.D. Pollard. 2001. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem*. 70:649-76.
- Ho, H.Y., R. Rohatgi, A.M. Lebensohn, M. Le, J. Li, S.P. Gygi, and M.W. Kirschner. 2004. Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell*. 118:203-16.
- Hoffman, G.R., and R.A. Cerione. 2002. Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett*. 513:85-91.

- Innocenti, M., A. Zucconi, A. Disanza, E. Frittoli, L.B. Areces, A. Steffen, T.E. Stradal, P.P. Di Fiore, M.F. Carlier, and G. Scita. 2004. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol.* 6:319-27.
- Jackson, P.K., A.G. Eldridge, E. Freed, L. Furstenthal, J.Y. Hsu, B.K. Kaiser, and J.D. Reimann. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10:429-39.
- Jaffe, A.B., and A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:247-69.
- Jentsch, S. 1992. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet.* 26:179-207.
- Jordan, P., R. Brazao, M.G. Boavida, C. Gespach, and E. Chastre. 1999. Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene.* 18:6835-9.
- Kamura, T., D. Burian, Q. Yan, S.L. Schmidt, W.S. Lane, E. Querido, P.E. Branton, A. Shilatifard, R.C. Conaway, and J.W. Conaway. 2001. Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 276:29748-53.
- Knowles, M.A., J.S. Aveyard, C.F. Taylor, P. Harnden, and S. Bass. 2005. Mutation analysis of the 8p candidate tumour suppressor genes DBC2 (RHOBTB2) and LZTS1 in bladder cancer. *Cancer Lett.* 225:121-30.
- Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H.D. Ulrich, T.U. Mayer, and S. Jentsch. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell.* 96:635-44.
- Kopp, M. 2006. Charakterisierung von Bindungspartnern der atypischen GTPase RhoBTB3. *Diplomarbeit.* Universität zu Köln
- Krek, W. 2003. BTB proteins as henchmen of Cul3-based ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol.* 5:950-1.
- Kurz, T., L. Pintard, J.H. Willis, D.R. Hamill, P. Gonczy, M. Peter, and B. Bowerman. 2002. Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science.* 295:1294-8.
- Lang, P., F. Gesbert, M. Delespine-Carmagnat, R. Stancou, M. Pouchelet, and J. Bertoglio. 1996. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *Embo J.* 15:510-9.

- Lebowitz, P.F., W. Du, and G.C. Prendergast. 1997. Prenylation of RhoB is required for its cell transforming function but not its ability to activate serum response element-dependent transcription. *J Biol Chem.* 272:16093-5.
- Li, X., and B. Lim. 2003. RhoGTPases and their role in cancer. *Oncol Res.* 13:323-31.
- Liakopoulos, D., T. Busgen, A. Brychzy, S. Jentsch, and A. Pause. 1999. Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5510-5.
- Lisztwan, J., G. Imbert, C. Wirbelauer, M. Gstaiger, and W. Krek. 1999. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev.* 13:1822-33.
- Lovering, R., I.M. Hanson, K.L. Borden, S. Martin, N.J. O'Reilly, G.I. Evan, D. Rahman, D.J. Pappin, J. Trowsdale, and P.S. Freemont. 1993. Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2112-6.
- Macias, M.J., S. Wiesner, and M. Sudol. 2002. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett.* 513:30-7.
- Maeda, I., T. Ohta, H. Koizumi, and M. Fukuda. 2001. In vitro ubiquitination of cyclin D1 by ROC1-CUL1 and ROC1-CUL3. *FEBS Lett.* 494:181-5.
- Maniatis, T. 1999. A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev.* 13:505-10.
- Melnick, A., K.F. Ahmad, S. Arai, A. Polinger, H. Ball, K.L. Borden, G.W. Carlile, G.G. Prive, and J.D. Licht. 2000. In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. *Mol Cell Biol.* 20:6550-67.
- Misawa, K., T. Nosaka, S. Morita, A. Kaneko, T. Nakahata, S. Asano, and T. Kitamura. 2000. A method to identify cDNAs based on localization of green fluorescent protein fusion products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3062-6.
- Murphy, C., R. Saffrich, M. Grummt, H. Gournier, V. Rybin, M. Rubino, P. Auvinen, A. Lutcke, R.G. Parton, and M. Zerial. 1996. Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature.* 384:427-32.
- Neckers, L. 2006. Chaperoning oncogenes: Hsp90 as a target of geldanamycin. *Handb Exp Pharmacol:*259-77.

- Nobes, C.D., I. Lauritzen, M.G. Mattei, S. Paris, A. Hall, and P. Chardin. 1998. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol.* 141:187-97.
- Ohno, H. 2004. Pathogenetic role of BCL6 translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Histol Histopathol.* 19:637-50.
- Parenti, A., L. Morbidelli, X.L. Cui, J.G. Douglas, J.D. Hood, H.J. Granger, F. Ledda, and M. Ziche. 1998. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem.* 273:4220-6.
- Park, J.I., S.W. Kim, J.P. Lyons, H. Ji, T.T. Nguyen, K. Cho, M.C. Barton, T. Deroo, K. Vleminckx, R.T. Moon, and P.D. McCrea. 2005. Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell.* 8:843-54.
- Passmore, L.A., and D. Barford. 2004. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J.* 379:513-25.
- Pickart, C.M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 70:503-33.
- Pintard, L., J.H. Willis, A. Willems, J.L. Johnson, M. Srayko, T. Kurz, S. Glaser, P.E. Mains, M. Tyers, B. Bowerman, and M. Peter. 2003. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature.* 425:311-6.
- Plate, K.H., G. Breier, and W. Risau. 1994. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol.* 4:207-18.
- Prendergast, G.C. 2001. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 1:162-8.
- Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm, and B. Seraphin. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* 24:218-29.
- Ramos, S., F. Khademi, B.P. Somesh, and F. Rivero. 2002. Genomic organization and expression profile of the small GTPases of the RhoBTB family in human and mouse. *Gene.* 298:147-57.
- Rivero, F., H. Dislich, G. Glockner, and A.A. Noegel. 2001. The *Dictyostelium discoideum* family of Rho-related proteins. *Nucleic Acids Res.* 29:1068-79.

- Sahai, E., and C.J. Marshall. 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2:133-42.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. 1998. Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory*. Cold Spring, NY.
- Scheffner, M., U. Nuber, and J.M. Huibregtse. 1995. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*. 373:81-3.
- Schrimpf, G. 2000. Gentechnische Methoden. *Spektrum*.
- Singer, J.D., M. Gurian-West, B. Clurman, and J.M. Roberts. 1999. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev*. 13:2375-87.
- Siripurapu, V., J. Meth, N. Kobayashi, and M. Hamaguchi. 2005. DBC2 significantly influences cell-cycle, apoptosis, cytoskeleton and membrane-trafficking pathways. *J Mol Biol*. 346:83-9.
- Stogios, P.J., G.S. Downs, J.J. Jauhal, S.K. Nandra, and G.G. Prive. 2005. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol*. 6:R82.
- St-Pierre, B., Z. Jiang, S.E. Egan, and E. Zacksenhaus. 2004. High expression during neurogenesis but not mammaryogenesis of a murine homologue of the Deleted in Breast Cancer2/Rhobtb2 tumor suppressor. *Gene Expr Patterns*. 5:245-51.
- Studier, F.W., and B.A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. 189:113-30.
- Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 81:153-208.
- Taylor, W.R., A.H. Schonthal, J. Galante, and G.R. Stark. 2001. p130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53. *J Biol Chem*. 276:1998-2006.
- Tu, Y., S. Wu, X. Shi, K. Chen, and C. Wu. 2003. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 113:37-47.
- Valencia, A., P. Chardin, A. Wittinghofer, and C. Sander. 1991. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*. 30:4637-48.

- van Muijen, G.N., K.F. Jansen, I.M. Cornelissen, D.F. Smeets, J.L. Beck, and D.J. Ruiter. 1991. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer*. 48:85-91.
- Waldman, T., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*. 55:5187-90.
- Wang, P., H. Gao, Y. Ni, B. Wang, Y. Wu, L. Ji, L. Qin, L. Ma, and G. Pei. 2003. Beta-arrestin 2 functions as a G-protein-coupled receptor-activated regulator of oncoprotein Mdm2. *J Biol Chem*. 278:6363-70.
- Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:169-78.
- Wennerberg, K., and C.J. Der. 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*. 117:1301-12.
- Wilkins, A., Q. Ping, and C.L. Carpenter. 2004. RhoBTB2 is a substrate of the mammalian Cul3 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev*. 18:856-61.
- Xu, L., Y. Wei, J. Reboul, P. Vaglio, T.H. Shin, M. Vidal, S.J. Elledge, and J.W. Harper. 2003. BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*. 425:316-21.
- Zhang, D.D., S.C. Lo, J.V. Cross, D.J. Templeton, and M. Hannink. 2004. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol*. 24:10941-53.
- Zigmond, S.H. 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 16:99-105.

Anhang

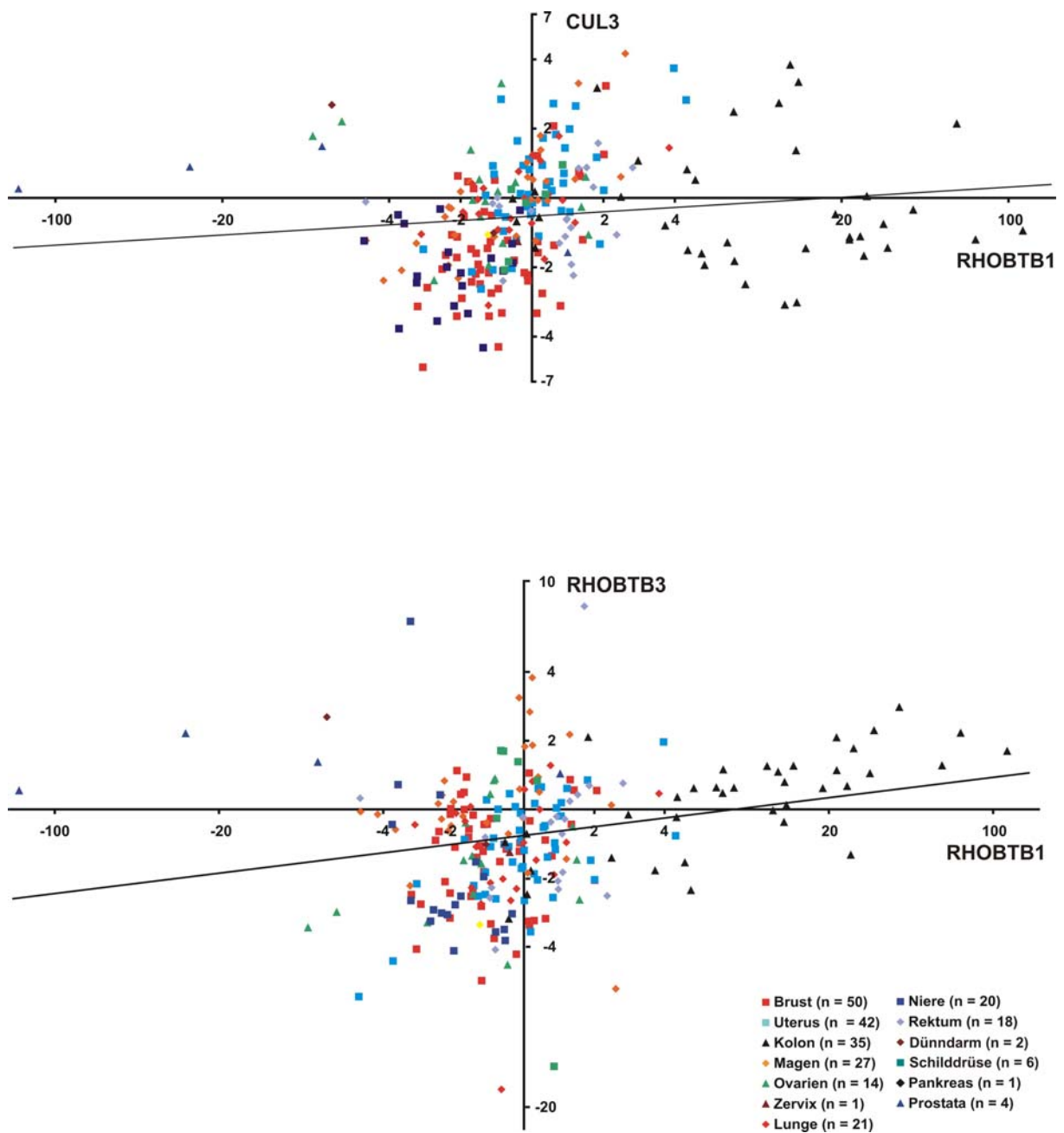


Abbildung A1 Korrelation der Veränderung der Expressionslevel von RHOBTB1 versus CUL3 und RHOBTB1 versus RHOBTB3 in Tumorgewebe. Für jede Probe wurde die x-fache Veränderung von RHOBTB1 und CUL3 (obere Grafik) sowie RHOBTB1 und RHOBTB3 (untere Graphik) zwischen normalem und tumoralem Gewebe durch Quantifizierung der Membranen aus Abb. 3. ermittelt. Die Regressionsgerade von RHOBTB1 versus CUL3 lautet $y = 0,06x - 0,04$ ($r = 0,1526$, $n = 237$; $P = 0,0187$) und bei RHOBTB1 versus RHOBTB3 $y = 0,14x - 0,13$ ($r = 0,2892$, $n = 237$; $P = 6,04 \times 10^{-6}$). Proben einer Gewebegruppe sind mit Farben unterlegt, die Anzahl jeder Population ist angegeben.

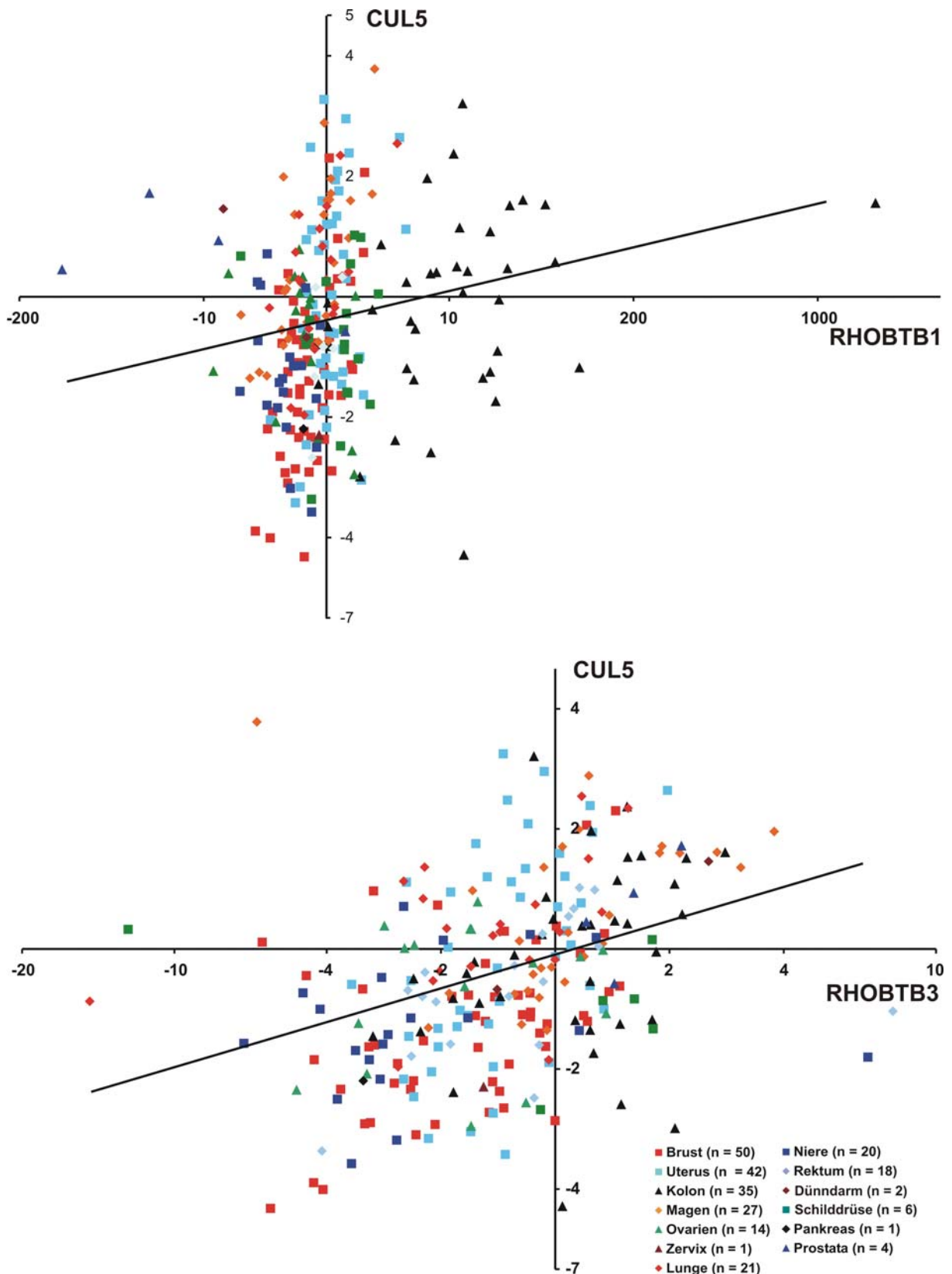


Abbildung A2 Korrelation der Änderung der Expressionslevel von RHOBTB1 versus CUL5 und RHOBTB3 versus CUL5 in Tumorgeweben. Für jede Probe wurde die x-fache Veränderung von RHOBTB1 bzw. RHOBTB3 und CUL5 zwischen normalem Gewebe und Tumorgewebe durch Quantifizierung der Membranen aus Abb. 3. ermittelt. Die Regressionsgerade von RHOBTB1 versus CUL5 lautet $y = 0,08x - 0,07$ ($r = 0,1997$ $n = 237$; $P = 0,0019$) und bei RHOBTB3 versus CUL5 $y = 0,31x - 0,03$ ($r = 0,3901$ $n = 237$; $P = 4,19 \times 10^{-10}$). Proben einer Gewebegruppe sind mit Farben unterlegt, die Anzahl jeder Population ist angegeben.

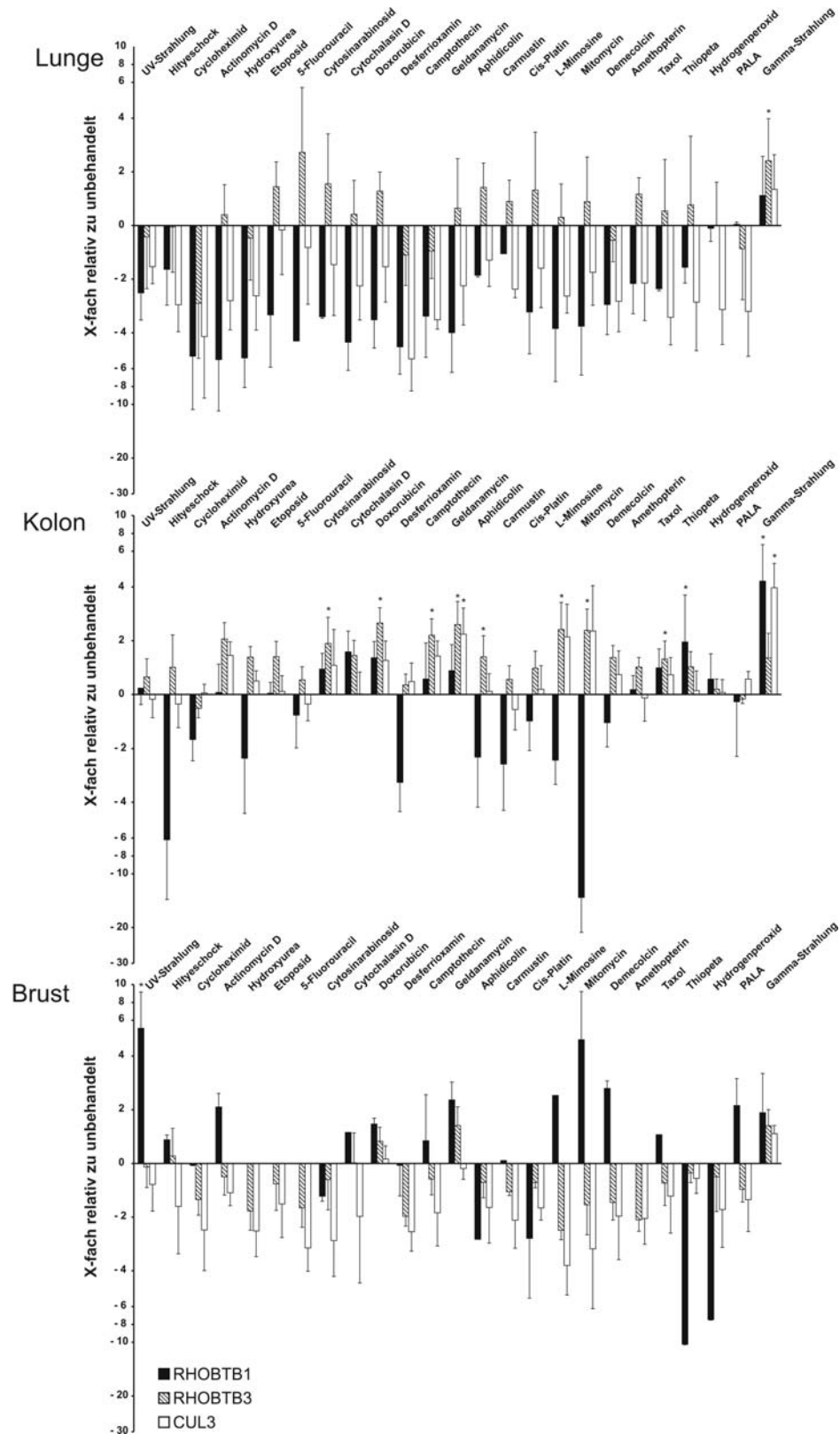


Abbildung A3 Expressionsveränderung von RHOBTB1, RHOBTB3 und CUL3 in ausgewählten Tumorzelllinien. Für jede Behandlung wurde die prozentuale Veränderung der Expression von RHOBTB1, RHOBTB3 und CUL3 in Lungen- (n = 3), Kolon- (n = 6) und Brusttumorzelllinie (n = 3) auf die unbehandelte Kontrolle bezogen berechnet. Die Daten wurden durch Quantifizierung wie in Legende von Abb. 3 beschrieben. Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM, *standard error of the mean*) sind dargestellt. Sterne markieren statistische Signifikanzunterschiede mit *two-way* ANOVA ermittelt (** P < 0,01; * P < 0,05). Aufgrund fehlender Daten konnte für RHOBTB1 nur *one-way* ANOVA durchgeführt werden.

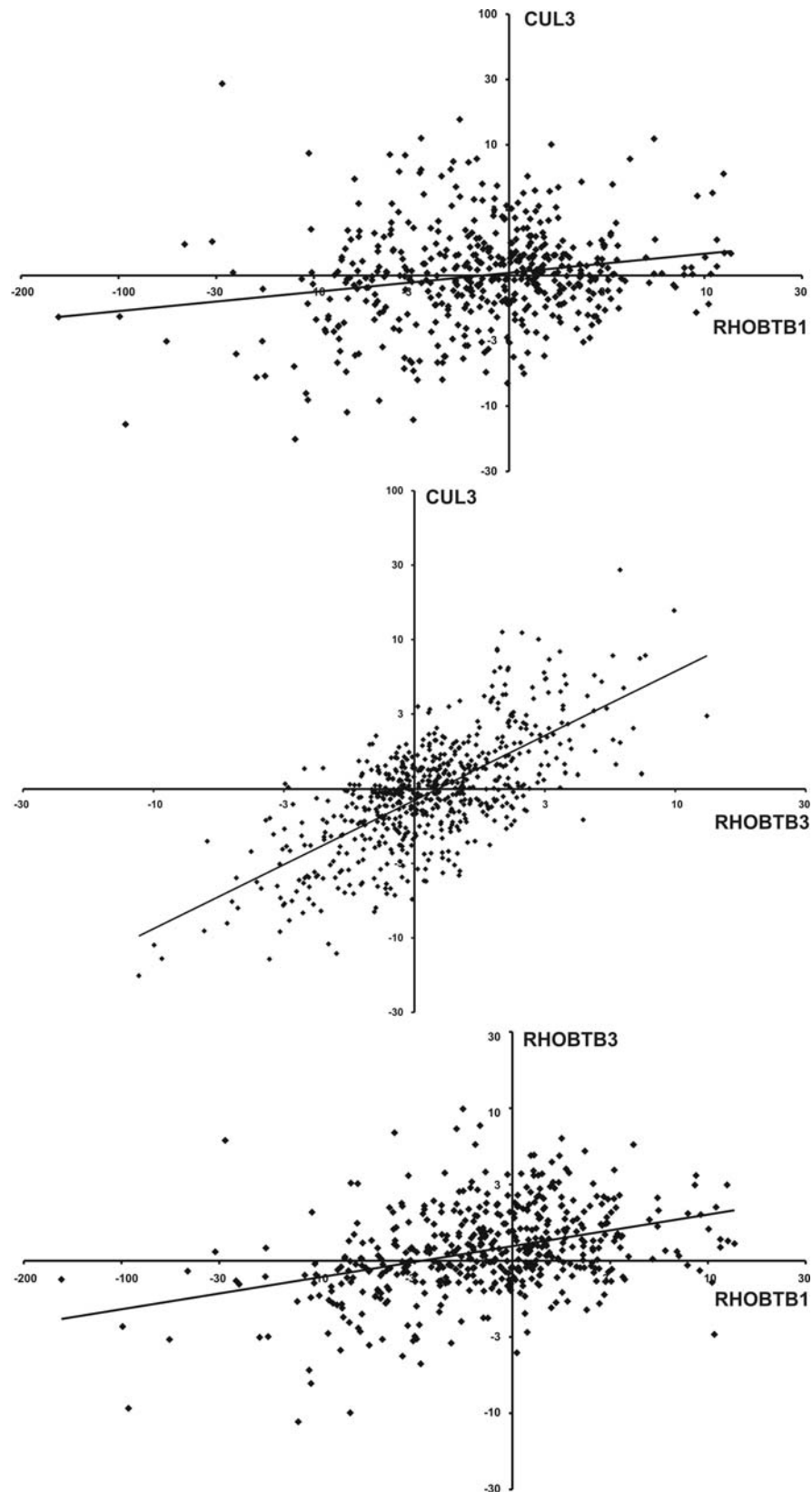


Abbildung A4 Korrelation der Veränderung der Expressionslevel von RhoBTB1 versus CUL3 (oben), RHOBTB3 versus CUL3 (Mitte) und RHOBTB1 versus RHOBTB3 (unten). Die Kalkulation der Veränderung jeder Probe erfolgte durch Quantifizierung von der CCLPA-Membran (Abb. 3). Die Regressionsgerade für RHOBTB1 vs. CUL3 lautet $y = 0,15x + 0,02$ ($r = 0,192$, $P = 8,7 \times 10^{-48}$), für RHOBTB3 vs. CUL3 ist $y = 0,86x - 0,08$ ($r = 0,6956$, $P = 8,7 \times 10^{-8}$) und für RHOBTB1 vs. RHOBTB3 ist $y = 0,21x + 0,09$ ($r = 0,3665$, $P = 2,2 \times 10^{-6}$).

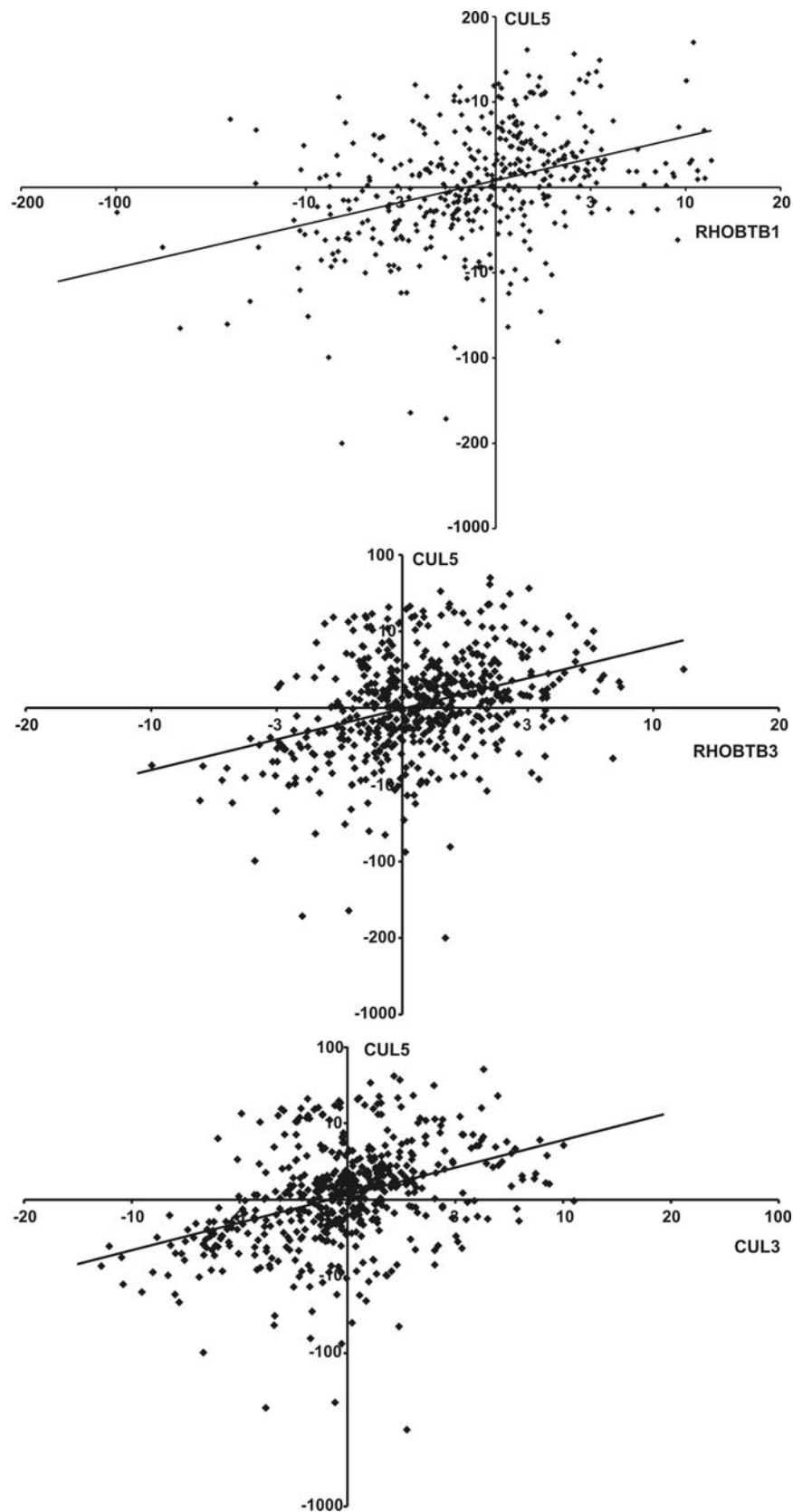


Abbildung A5 Korrelation der Veränderung der Expressionslevel von RhoBTB1 versus CUL5 (oben), RHOBTB3 versus CUL5 (Mitte) und CUL3 versus CUL5 (unten). Die Kalkulation der Veränderung jeder Probe erfolgte durch Quantifizierung von der CCLPA-Membran (Abb. 3). Die Regressionsgerade für RHOBTB1 vs. CUL5 lautet $y = 0,79x + 0,01$ ($r = 0,3778$, $P = 1,21 \times 10^{-9}$), für RHOBTB3 vs. CUL5 ist $y = 0,72x - 0,06$ ($r = 0,3619$, $P = 3,13 \times 10^{-9}$) und für CUL3 vs. CUL5 ist $y = 0,51x + 0,08$ ($r = 0,3916$, $P = 5,37 \times 10^{-10}$).

Tabelle A1 Korrelationsanalyse der Änderung des Expressionslevel von RHOBTB und CUL3.

Gewebe & Diagnose	RHOBTB3 vs. CUL3		RHOBTB1 vs. CUL3		RHOBTB1 vs. RHOBTB3	
	r	t-Test	r	t-Test	r	t-Test
1 Lungenkarzinom A549	0,8800	***	0,5544	**	0,6768	***
2 Lungenzellkarzinom NCI-H460	0,7244	***	na	na	na	na
3 Lungenkarzinom NCI-H1299	0,8245	***	0,1709		0,1219	
4 Kolonkarzinom HCT116	0,8642	***	0,0682		0,0796	
5 Kolonkarzinom HCT116 p21-/-	0,5611	**	0,6003	**	0,2226	
6 Kolonkarzinom HCT116 p53	0,6784	***	0,3341		0,0032	
7 Kolon-Adenokarzinom HCT-15	0,7281	***	0,5841	**	0,3228	
8 Kolon-Adenokarzinom HT-29	0,8117	***	0,6076	**	0,5104	*
9 Brustkarzinom MDA-MB-435S	0,8721	***	na	na	na	na
10 Brust-Adenokarzinom MDA-MB-231	0,8405	***	0,0819		0,1014	
11 Brust-Adenokarzinom MCF7	0,7364	***	0,5007	*	0,3071	
12 Ovarien-Adenokarzinom SK-OV-3	0,2215		0,1442		0,7219	***
13 Zervixkrebs HeLa	0,6004	**	-0,0455		0,3229	
14 Prostatakrebs DU 145	0,7639	***	0,1682		0,1778	
15 Prostata-Adenokarzinom PC-3	0,4783	*	na	na	na	na
16 Hautmelanom SK-MEL-28	0,8325	***	0,2781		0,2446	
17 Hautmelanom SK-MEL-5	0,8730	***	0,3914		0,4614	
18 Gehirn-Neuroblastom SK-N-SH	-0,1069		-0,2780		0,4351	*
19 Gehirn-Neuroblastom IMR-32	0,1386		0,0177		0,3419	
20 Gehirn-Glioblastom U-87 MG	0,7428	***	0,1351		0,2235	
21 renales Adenokarzinom 786-O	0,7725	***	0,0481		0,1564	
22 renales Adenokarzinom ACHN	0,8653	***	0,4676	*	0,4989	*
23 Leberkarzinom Hep G2	0,7807	***	0,2831		0,5437	**
24 Kolon-Adenokarzinom COLO 587	0,6819	***	0,5617	**	0,7737	***
25 Knochensarkom U-2 OS	0,7070	***	0,3615		0,4075	
26 Epidermoidkarzinom A431	0,8021	***	na	na	na	na
26 gesamt	0,6956	***	0,1920	***	0,3665	***

Die Membran beinhaltet 26 verschiedene humane Tumorzelllinien, die jeweils mit 25 verschiedenen chemotherapeutischen Agenzien, oxidativen Stressinduktoren und Strahlung behandelt wurden. Die Kalkulation umfasst für jede Zelllinie alle Behandlungen (na, nicht analysiert). r = Korrelationskoeffizient. Sterne markieren statistische Signifikanzunterschiede mit Students t-Test ermittelt (*** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05). n = 488 für RHOBTB1 und n = 650 für RHOBTB3 und CUL3.

Tabelle A2 Korrelationsanalyse der Änderung des Expressionslevel von RHOBTB und CUL5.

Gewebe & Diagnose	RHOBTB3 vs. CUL5		RHOBTB1 vs. CUL5		CUL3 vs. CUL5	
	r	t-Test	r	t-Test	r	t-Test
1 Lungenkarzinom A549	0,7107	***	0,7625	***	0,7717	***
2 Lungenzellkarzinom NCI-H460	0,5371	**	na	na	0,7257	***
3 Lungenkarzinom NCI-H1299	0,3267		0,3907		0,4277	*
4 Kolonkarzinom HCT116	0,5478		-0,2041		0,3449	
5 Kolonkarzinom HCT116 p21-/-	0,1557		0,5031	*	0,7070	***
6 Kolonkarzinom HCT116 p53	0,0355		0,3447		0,4992	*
7 Kolon-Adenokarzinom HCT-15	0,5548	**	0,3814		0,8632	***
8 Kolon-Adenokarzinom HT-29	0,7015	***	0,3420		0,7239	***
9 Brustkarzinom MDA-MB-435S	0,5828	**	na		0,6458	**
10 Brust-Adenokarzinom MDA-MB-231	0,5033	*	0,0257		0,4897	*
11 Brust-Adenokarzinom MCF7	0,5968	**	0,5408	*	0,3604	
12 Ovarien-Adenokarzinom SK-OV-3	-0,0488		0,1085		0,5926	**
13 Zervixkrebs HeLa	-0,1122		-0,3498		0,3739	
14 Prostatakrabs DU 145	0,3343		-0,1867		0,7032	***
15 Prostata-Adenokarzinom PC-3	0,3884		na		0,0685	***
16 Hautmelanom SK-MEL-28	0,1605		0,0089		0,1658	
17 Hautmelanom SK-MEL-5	na		na		na	na
18 Gehirn-Neuroblastom SK-N-SH	0,3455		-0,1838		0,5873	**
19 Gehirn-Neuroblastom IMR-32	0,5773	**	0,1787		0,6779	***
20 Gehirn-Glioblastom U-87 MG	0,5423	*	0,2367		0,6377	**
21 renales Adenokarzinom 786-O	0,2201		0,1969		0,4625	*
22 renales Adenokarzinom ACHN	0,4356	*	0,4270		0,5753	**
23 Leberkarzinom Hep G2	0,7459	***	0,7387	***	0,6825	***
24 Kolon-Adenokarzinom COLO 587	0,3732		0,4212	*	0,7851	***
25 Knochensarkom U-2 OS	0,5192	**	0,1090		0,7793	***
26 Epidermoidkarzinom A431	0,7597	***	na		0,8607	***
26 gesamt	0,3620	***	0,3778	***	0,3930	***

Die Membran beinhaltet 26 verschiedene humane Tumorzelllinien, die jeweils mit 25 verschiedenen chemotherapeutischen Agenzien, oxidativen Stressinduktoren und Strahlung behandelt wurden. Die Kalkulation umfasst für jede Zelllinie alle Behandlungen (na, nicht analysiert). r = Korrelationskoeffizient. Sterne markieren statistische Signifikanzunterschiede mit Students t-Test ermittelt (*** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05). n = 488 für RHOBTB1, n = 650 für RHOBTB3 und n = 547 für CUL5.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Angelika A. Noegel betreut worden.

Köln, im Mai 2006

Jessica Berthold

Teilpublikationen:

J. Berthold, S. Ramos, P. Zigrino, C. Mauch, F. Rivero. Expression analysis of RHOBTB and CUL3 in normal and tumor tissues. Cancer, eingereicht (2006).

Lebenslauf

Name Jessica Berthold

Geburtsdatum 28.09.1977

Geburtsort Gummersbach

Staatangehörigkeit deutsch

Schulbildung:

1984-1988 Besuch der Grundschule

1988-1997 Besuch des Gymnasiums in Gummersbach mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulstudium:

1997-2002 Studium der Biologie an der Universität zu Köln

09.1999-03.2000 Tätigkeit als Tutor der Universität zu Köln

März/April 2001 Auslandspraktikum: Entwicklung von künstlichen Riffen, Scarborough, Trinidad und Tobago

Dezember 2001 Diplomprüfung in Biologie mit den Schwerpunkten Genetik, Tierphysiologie und Pharmakologie

01.2002-12.2002 Diplomarbeit mit dem Thema „Immunhistochemische Untersuchung der hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen im visuellen System der Ratte und der Maus“ am FZ Jülich

seit Mai 2003 Praktische Durchführung der Dissertation bei Prof. Angelika A. Noegel in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Francisco Rivero am Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Thema „Rho GTPasen der RhoBTB Familie: Charakterisierung und Rolle in der Tumorentstehung“

September 2004 Kollaborationsarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Pontus Aspenström am Ludwig Institut für Tumorforschung, Uppsala, Schweden